

Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Klaus Holldack

Die Wirkung der Folsäure auf die Proliferation
von nichtmegaloblastischem menschlichem
Knochenmark in vitro.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Peter Willigerodt
aus Essen

1970
—

Aus der 1. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Klaus Holidack

Die Wirkung der Folsäure auf die Proliferation
von nichtmegaloblastischem menschlichem
Knochenmark in vitro.

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Peter Willigerodt

aus Essen

Dekan: Professor Dr. med. Herbert Lax
Referent: Professor Dr. med. Irene Boll
Korreferent: Professor Dr. med. Horst Brücher



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 28. 5. 1970

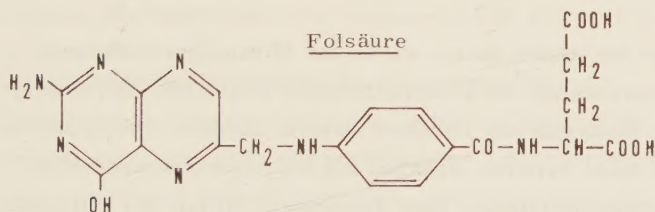
INHALT

	Seite
I. Einleitung und Fragestellung	5
II. Methode	15
III. Ergebnisse	40
IV. Diskussion	49
V. Zusammenfassung	57
VI. Literatur	58

Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung und Fragestellung.

MITCHELL, SNELL und WILLIAMS (42) isolierten 1941 aus Spinatblättern in hochkonzentrierter Form eine Folsäure genannte Substanz, die weitverbreitet besonders in Hefen, Pilzen, Leber und Niere vorkommt. Mit dem Vitamin B_C (von HOGAN und PARROTT), dem Vitamin M (von DAY, LONGSTONE und DARBY), dem Lactobazillus - casei - Faktor (SNELL und PETERSON), dem Norit - Eluat - Faktor und dem Eluat - Faktor (STOKSTAD und MANNING) erwies sich Folsäure identisch und konnte 1946 von ANGIER und Mitarbeitern synthetisiert werden (1, 4, 22, 55, 65). Die chemische Strukturaufklärung ergab eine Pteroylglutaminsäure, eine orangegelbe, hitzelabile zweibasische Säure mit einem pH = 3 in wässriger Lösung (47, 54).



Als freie Pteroylglutaminsäure oder in Form weiterer natürlich vorkommender Konjugate kann Folsäure sowohl von Mikroorganismen als auch vom tierischen und menschlichen Organismus aufgenommen werden (4). Die Konjugate werden durch Konjugasen aus Darmflora und Dünndarmsekreten gespalten (65) und als Pteroylglutaminsäure resorbiert (22, 30, 62). Hauptsächlich wird die Folsäure in der Leber als Präfolsäure A, einer 5-Methyl-FH₄, gespeichert und dort enzymatisch in Folinsäure umgewandelt, die mit Leukovorin

und Citrovorumfaktor identisch ist (5, 16, 21, 27, 43, 62).

Die von SAUBERLICH und BAUMANN 1948 als 5-Formyl-5,6,7,8 Tetrahydropterin-Glutaminsäure entdeckte Folinsäure galt lange Zeit als die enzymatisch aktive Substanz der Folsäure. Eine wesentliche Aufgabe der Folsäure im Stoffwechsel ist die Übertragung von C_1 -Bruchstücken (2, 62, 65).

Neuere Ergebnisse zeigen jedoch, daß Folinsäure lediglich dadurch entsteht, daß bei neutralem oder schwach alkalischem pH-Wert die instabile N_{10} -Formyltetrahydrofolsäure, der Anhydrocitrovorumfaktor, in das stabile Isomere N_5 -Formyltetrahydrofolsäure umgewandelt wird. Die Folinsäure kann in einer ATP-abhängigen Reaktion durch das Enzym Folinsäure-Isomerase wieder in Anhydrocitrovorumfaktor umgewandelt werden, wodurch bei Folsäuremangelerscheinungen ein mittelbarer Weg zur Bildung aktiver Folsäure- C_1 -Verbindungen besteht (64).

Erst in den letzten Jahren wurde der Wirkungsmechanismus der Folsäure bei der Zellproliferation aufgeklärt. Durch enzymatische Reduktion von Folsäure entsteht zunächst Dihydrofolsäure und in einer weiteren Reaktion mit Dihydrofolsäurereduktase die Tetrahydrofolsäure oder Folinsäure. Mittels der Folinsäure-Isomerase wird Folinsäure zur de-novo-Synthese von Thyminnucleotiden und somit zur Bildung von DNS verwandt. Die Bildung von DNS wiederum ist entscheidend für die Zellproliferation (5, 62).

Aus Präfolsäure A scheint Tetrahydrofolsäure jedoch nur unter Einwirkung von Vitamin B_{12} zu entstehen (4, 5, 59), wobei Vitamin C vermutlich die reduzierten Folsäureverbindungen vor Oxydation schützt (20, 62).

Der gesunde menschliche Organismus deckt seinen Folsäurebedarf wahrscheinlich durch die intestinale Synthese der Darmbakterien (4), so daß der physiologische Bedarf nur auf Tierversuchen basierend geschätzt werden kann (65). In der Literatur schwanken die Angaben zwischen dem Minimalbedarf von 5 γ /die und 0,4 mg/die mit mittleren Werten von 0,1 - 0,2 mg/die (4, 33, 39, 43, 65). Wird die intestinale Synthese, die Resorption oder die Folinsäurebildung gestört bzw. der Bedarf im Stoffwechsel erhöht, so kann ein Folsäuremangel entstehen (65), der besonders stark proliferierende Gewebe wie das Knochenmark beeinflusst (45, 62). Vielfach gibt die Therapie dieser Mangelerkrankungen, die ursächlich oder als Begleitsymptom mehrerer Erkrankungen auftreten, Aufschluß über die Wirkung der Folsäure auf die Hämatopoese. Trotz umfangreicher Forschungsarbeit ist lediglich sicher bekannt, daß bei einem Folsäuredefizit, was auch immer dessen Ursache sein möge, eine Reifungsstörung der Erythropoese mit Megaloblastose im Knochenmark und Makrozytose im peripheren Blut auftritt (65).

Die megaloblastische Umwandlung des Knochenmarks zeigt eine Hyperplasie der erythropoetischen und in geringem Maße der granulopoetischen Zellen mit ausgeprägter Linksverschiebung und einer erheblichen Zunahme der Zell- und Kerngrößen (52). Untersuchungen von MENZIES u. a. ergaben, daß bei Folsäuremangel in megaloblastären Knochenmarkkulturen wahrscheinlich die Mitose und Interphase verlängert wird mit Desorganisation einzelner Chromosomen (29, 40). BOLL beobachtete phasenoptisch die Entstehung von typischen Riesenmetamyelozyten durch postmitotisches Zusammenfließen zweier Myelozyten (7). Als Entstehungsursache der Riesenzellen vermutet BOCK durch Tetrahydrofolsäuremangel herabgesetzte Thyminmethylgruppenbildung und somit eine verminderte DNS-Synthese bei unveränderter Protein- und RNS-Synthese (5, 45).

In zahlreichen Veröffentlichungen wird Folsäuremangel mit verschiedenen megaloblastischen Anämien in Zusammenhang gebracht, wobei jedoch eine Behandlung mit Folsäure nicht regelmäßig zu hämatologischen Remissionen führt.

Megaloblastenanämien bei idiopathischer Steatorrhoe und tropischer Sprue weisen auf eine ungenügende Folsäureresorption hin, die gelegentlich mit mangelnder Vitamin B₁₂-Resorption verbunden sein kann (4, 31, 32). Sollte primär ein Vitamin B₁₂-Mangel vorliegen, so wird eine Folsäure-Therapie wenigstens eine temporäre hämatologische Remission hervorrufen (49), wogegen eine Cyanocobalamin-Therapie wirkungslos ist, wenn Folsäuremangel vorliegt (24). Es ist möglich, daß eine parenterale Folsäuregabe auch die intestinale Resorption von Folsäure verbessert. Auch bei nichttropischer Sprue hat die Folsäure neben der hämatopoetischen Wirkung oft einen günstigen Einfluß auf die Diarrhoe (4, 43).

Nach GIRDWOOD genügen zur Dauertherapie der Spruegruppe eine Kombination von täglich 15-20 mg Folsäure per os zusammen mit monatlich 100 γ Cyanocobalamin parenteral (24). Diese Kombinationstherapie (15, 49) erscheint auch bei allen ernährungsbedingten Megaloblasten-Anämien sinnvoll (24). JASINSKI hält eine Dauertherapie dieser Folsäuremangelerkrankungen nur selten für notwendig (30).

Die megaloblastischen Schwangerschaftsanämien, die pathogenetisch allgemein als Folsäure-Mangelerkrankungen angesehen werden (41), sind durch das Auftreten von Megaloblasten im Knochenmark mit zuweilen normoblastischer Proliferation charakterisiert. Diese azidophilen Megaloblasten werden zum Teil als intermediäre Übergangsformen angesehen und mitunter

als Makronormoblasten bezeichnet (15, 19). Nach DAWSON stellt der Grad megaloblastischer Veränderungen, die Zahl auftretender Riesenmetamyelozyten und HOWELL-JOLLY-Körper einen Maßstab für den Folsäuremangel dar, obwohl wahrscheinlich nur ein Teil der an Folsäure verarmten Graviden im Knochenmark sichtbare Zellveränderungen zeigt (19).

Bei einer von sechs an megaloblastischer Anämie erkrankten Schwangeren beobachtete COX weder reduzierte Vitamin B₁₂ - noch verminderte Folsäure- oder Vitamin C-Konzentrationen (18). Nach VARADI treten in 2,2% , nach DAWSON in 2,8 bis 4,2% aller Schwangerschaften megaloblastische Veränderungen im Knochenmark auf, die nach VARADI in allen 238 untersuchten Fällen auch Kernreifungsdefekte besonders Hypersegmentation der Leukozyten aufweisen (19, 61).

Therapeutische Folsäuregaben, deren Wirkungs-dosis bei primärem Folsäuremangel unbekannt ist (24), führen zu einer überraschend schnellen Remission des megaloblastischen Knochenmarks. Mitunter kann schon nach einigen Stunden kein Megaloblast mehr nachgewiesen werden. Zunächst werden Mitosen basophiler Erythroblasten zahlreicher, später treten verstärkt polychromatische Zellen auf und das Mitosemaximum verlagert sich zu diesen reiferen Zellen. Schließlich erscheinen oxyphile Zellen und die Retikulozytenkrise erreicht nach 5-6 Tagen ihren Höhepunkt. Das Knochenmark bleibt überaktiv bis die Anämie überwunden ist (22, 66).

Sehr differenziert zeigt sich der Einfluß der Folsäure auf das menschliche Knochenmark bei der als Vitamin B₁₂-Mangel-erkrankung bekannten perniziösen Anämie. Während noch SPIES und Mitarbeiter 1945 von einer ausgezeichneten Wirkung berichteten, wobei in wenigen Tagen eine vollständige hämatologische Remission und in der Mehrzahl der Fälle eine Besserung

der HUNTERSchen Glossitis erzielt wurde (57), konnten in der Folgezeit nach längerer Behandlungsdauer neue akute Schübe beobachtet werden (30, 65). Gegenüber den gastrointestinalen Symptomen der Erkrankung zeigte sich Folsäure unwirksam (65). Andererseits verschlechterten sich die neurologischen Symptome zahlreicher Fälle auch in Kombination mit Vitamin B₁₂ in Form funikulärer Myelosen (4, 24, 30, 43).

JASINSKI vermutet, Folsäure mobilisiere die restlichen im Organismus vorhandenen Spuren von Vitamin B₁₂ für die Hämatopoese und entziehe sie dadurch dem Nervensystem. Gelegentlich können die ersten Symptome der funikulären Myelose bei Perniziosa-Patienten auftreten, bevor der Vitamin B₁₂-Mangel hämatologisch manifest wird (30).

GIRDWOOD nimmt dagegen an, der Vitamin B₁₂-Mangel führe eventuell zu einer Kompensation durch eine aktive Form der Folsäure, die nach Erschöpfung der Vitamin B₁₂ - Speicher die normoblastische Erythropoese ein weiteres Jahr oder länger aufrechterhalten kann. Sind schließlich auch die Folsäurespeicher erschöpft, entwickelt sich das Bild der Megaloblastenanämie (24).

GRANT berichtet von 10 Patienten mit myelopathischen und neurologischen Störungen bei gleichzeitiger megaloblastischer Erythropoese. Obwohl bei 7 Patienten Folsäuremangel und bei 3 Patienten Vitamin B₁₂ -Mangel entdeckt wurde, nimmt GRANT nicht an, daß Folsäuremangel direkt die neurologischen Störungen verursacht (25). Auch COX beobachtete bei der perniziösen Anämie eine verminderte Folsäure-Konzentration im Knochenmark, jedoch wertet er diesen Mangel nicht als ursächlichen Faktor, sondern als Zeichen der megaloblastischen Anämie. Entscheidend soll der Vitamin B₁₂-Mangel durch einen signifikanten Vitamin C-Mangel beeinflusst werden (18).

REYNOLDS schließt aus den Ergebnissen, die eine Wandlung der megaloblastischen Erythropoese durch Folsäure in eine normoblastische zeigen, auf den ursächlichen Zusammenhang von relativem Folsäure- bzw. Vitamin B₁₂-Mangel und Knochenmarks - sowie neurologischen Veränderungen (48). Eine Beziehung zwischen organischen Gehirnerkrankungen und Serumfolsäuremangel konnte BATATA in einer Untersuchung älterer Patienten feststellen (3).

BOCK und Mitarbeiter beobachteten als Kompensationsvorgänge des Vitamin B₁₂- Mangels im megaloblastären Knochenmark eine Aktivitätssteigerung der Thymidinkinase und Dihydrofolsäure-Reduktase. Bei perniziöser Anämie kann diese Aktivitätssteigerung den Vitamin B₁₂-Mangel möglicherweise wegen eines verminderten Substratangebots nicht ausgleichen.

Therapeutische Substratzufuhr durch Folsäure- und Thymidin- bzw. Thymingaben kann insofern die hämatologischen Mangelerscheinungen vorübergehend günstig beeinflussen (5).

SWENSEID und Mitarbeiter erkannten 1951 einen 5-100 fach höheren Folsäuregehalt in Leukozyten von Patienten mit akuten Leukämieformen gegenüber normalen Leukozyten. In Zellen chronisch myeloischer und chronisch lymphatischer Leukämien wurde ebenfalls eine deutlich erhöhte Folsäurekonzentration nachgewiesen (45, 60), während die Folsäureausscheidung in der Mehrzahl der Fälle verringert war (24, 26, 37). Dieser hohe Folsäuregehalt der Leukämiezellen (24) erklärt die temporären Therapieerfolge von Folsäureantagonisten wie Aminopterin, Amethopterin und dem Purinantagonist 6-Mercaptopurin (11, 26, 63), da die Antimetaboliten eine gesteigerte Substratkonkurrenz mit Folsäure eingehen können (43). Die Ergebnisse von LUDS und Mitarbeitern sprechen mehr für eine allgemeine Umwandlung des Stoffwechsels bei den malignen Erkrankungen als für einen

erhöhten Folsäurebedarf maligner Zellen (37).

In neueren Untersuchungen wies WILMANNS in myeloischen Zellen bei akuter und chronischer Leukämie eine hohe Aktivität der Dihydrofolsäure-Reduktase nach. Dieses Enzym ist nur in unreifen Zellen, also auch in normalen Knochenmarkszellen vorhanden. Zellteilung und Enzymmenge der FH_2 -Reduktase sollen jedoch nach ROBERTS und HALL auch bei hoher Mitoserate nicht voneinander abhängig sein (50). Ein wesentlicher therapeutischer Angriffspunkt der Folsäure-Antagonisten liegt nach WILMANNS in der Hemmung der Dihydrofolsäure-Reduktase, wobei die Affinität der Antagonisten zum Enzymprotein über 1000 mal so hoch wie die des physiologischen Substrats ist (63).

Auf diese hohe Affinität des Antagonisten führen auch BOLL und SCHLAG die Ergebnisse zurück, daß erst die ca. 250 - 600 fache Menge des Folsäurederivats Teropterin die Aminopterinwirkung auf menschliches Knochenmark in vitro aufhebt. Hierbei soll Teropterin gleiche Eigenschaften wie Folsäure besitzen. Bei lymphatischer und myeloischer Leukämie zeigt Teropterinzusatz keine Erhöhung der Mitoseindices (14).

Nach HIATT scheint die Behandlung der Leukämiker erfolgreicher zu verlaufen, wenn Antifolate appliziert werden, bevor ein genereller Folsäuremangel entsteht (45). Mitunter berichten Autoren, daß im leukämischen Knochenmark sogar megaloblastische Erythropoesen auftreten, die nach Folsäuregaben bzw. Absetzung der Antifolattherapie remittieren (24, 53).

Unterschiedliche Auffassungen bestehen darüber, ob Folsäuremangel, -umsatz und -ausscheidungsteste ein sicheres diagnostisches Hilfsmittel zur Erkennung neoplastischer Erkrankungen darstellen. Während ROSE, MAGNUS, WILMANNS und BURCHENAL aus Veränderungen im Folsäurestoffwechsel

auf bösartige Erkrankungen schließen, bezweifeln SPEKTOR, GIRDWOOD und HAEHNER diese diagnostische Bedeutung (24, 26, 38, 53, 56, 64). HÄRKÖNEN und Mitarbeiter fanden in Tierversuchen keinen Einfluß der Folsäure auf Wachstum und Mitoseaktivität von YOSHIDA-Sarkomen (27), während LITTLE durch Folsäuremangel das Wachstum vom ROUS-Sarkom vollständig hemmte (36). STOCK beobachtete in vitro einen wachstumshemmenden Effekt auf das Sarkom T 241 nach vermutlich toxischen Folsäuredosen, wogegen in vivo keine Wirkung zu erzielen war (58). An Zellen des Mäuseascitestumors beobachteten LETTRE und LANDSCHÜTZ eine Mitosehemmung mit Vermehrung der Metaphasen bis 50% (34).

Nach O' BRIEN wird die DNS-Synthese mit der folsäureabhängigen Thymidylatsynthese gesteuert, so daß eine ungehemmte Thymidylatsynthese zu unkontrollierter DNS-Synthese führt. Auf Grund dieser Reaktion vermutet O' BRIEN ein undifferenziertes Zellwachstum und somit die Entstehung der Krebszelle (45).

Untersuchungen von HAYS an überlebenden Knochenmarkzellen in glukosefreier Tyrodelösung ergaben keinen Einfluß der Folsäure auf die Proliferation (28). Im Knochenmark resezierter menschlicher Rippen beobachteten NORRIS und MAJNARICH eine Proliferationsverminderung in der Erythropoese nach Folsäurezugabe (44). In Kulturen von Kaninchenleber ergab Folsäure einen geringfügigen Anstieg der Zellzahlen, der Zusatz von Folsäure steigerte die Wirkung der Folsäure um das 30fache (35).

Eine Reifungsbeschleunigung mit Umwandlung der Megaloblasten in Normoblasten beobachtete PARREIRA in Knochenmarkkulturen mit Folsäurezusatz, wobei insbesondere der stathmokinetic Index für basophile Erythroblasten erhöht wurde (46). BOLL und SCHLAG fanden nach Teropterinzusatz in Konzentrationen

zwischen 1 und 10 mg% am normalen sowie am Knochenmark perniziöser und anderer Anämien in vitro zumeist eine Mitosehemmung vorwiegend mit einer Arretierung der weißen Vorstufen in der späten Metaphase. Bei Zusatz von 0,1 mg% und noch geringeren Teroproteinmengen wurde keine Beeinflussung des Knochenmarks mehr gefunden (14).

In Suspensionskulturen modifiziert nach LAJTHA versetzten SWAN und Mitarbeiter megaloblastisches Mark im Perniziosaserum mit Folsäure und beobachteten ein signifikant erhöhtes Zellwachstum und eine schnellere Reifung. Kein signifikantes Wachstum kernhaltiger Zellen ergab der Zusatz von Folsäure oder Folsäure auf normoblastisches Mark im Normalserum (59). Diese Beobachtung entspricht der Ansicht HÄRKÖNENS, daß Folsäure nur mitoseanregend wirkt, wenn zuvor ein Folsäuremangel bestand (27). SWAN vermutet, daß Folsäure im megaloblastischen Mark die Mitosen anregt, weil in diesem pathologisch veränderten Knochenmark eine größere Anzahl mitosefähiger Zellen vorhanden ist als im normoblastischen Mark (59).

Die sich zum Teil widersprechenden Ergebnisse der angeführten Untersuchungen in vivo und in vitro erlauben keine eindeutige Aussage über die Wirkung der Folsäure auf das menschliche Knochenmark. Unter Ausschaltung unkontrollierbarer nervaler und humoraler Faktoren, die in vivo zu ungenauen Ergebnissen führen könnten, soll in dieser Arbeit in vitro der Einfluß der Folsäure auf die Proliferation der Erythro- und Granulopoese untersucht werden. Gleichzeitig brauchen wir in vitro eine Ausschwemmung reifer Zellen ins Blut und eine eventuelle Umwandlung aus knochenmarkfremden Zellelementen nicht zu berücksichtigen (6).

II. Methode.

Vom Knochenmark 8 sternalpunktierter Patienten werden neben Originalausstrichen Koagulumkulturen nach der von BOLL und FUCHS modifizierten CARREL'schen Technik angelegt (12).

Durch diese Gewebezüchtungsmethode lassen sich Punktate in vitro einige Tage in ihrer ursprünglichen Form am Leben erhalten. Auf Deckgläser werden koagulierende Tropfen aus 40% Nativplasma, 50% HANKScher Lösung und 10% Corhormon gebracht, den entstandenen Koagula jeweils ein Knochenmarkbröckel und ein kleiner Tropfen Serum zugesetzt. In hohlgeschliffenen Objektträgern werden die Kulturen unter sterilen Kautelen mit Paraffin luftdicht verschlossen und im Brutschrank bei 37° C als hängende Tropfen bebrütet.

Von jedem Sternalpunktat werden Deckglaskulturen mit verschiedenen Zusätzen angelegt:

1. Kontrollkultur ohne Zusatz
2. Kulturen mit 1,5 mg% Folsäure
3. Kulturen mit 0,15 mg% Folsäure

Die Folsäure wird in Form des Präparats Folsan [®] der Firma Kali-Chemie den Kulturen zugesetzt.

Nach 24, 48 und 72 Stunden Bebrütungsdauer werden Ausstriche angefertigt, luftgetrocknet und anschließend nach PAPPENHEIM panoptisch gefärbt. Von jedem Präparat werden 1000 Zellen (in 5 Präparaten können nur 500 Zellen gezählt werden) einschließlich der Mitosephasen ausgewertet, wozu vorwiegend die hämatopoetische Zellen enthaltenden Randpartien der Bröckchenausstriche verwendet werden. Die gleichzeitig durchgeführte Differenzierung erfolgt nach morphologisch unterscheidbaren Zellklassen.

A: Bei der Erythropoese differenzieren wir in:

Proerythroblast PR als jüngste Zelle der roten Reihe mit rundem, dunkelviolettem Kern und 2-3 schwach hervortretenden Nucleolen. Das Chromatin hebt sich in feinkörniger dichter Netzstruktur scharf gegen den umgebenden schmalen, dunkelblauen Cytoplasmasaum ab, der gelegentlich perinucleär eine Aufhellungszone zeigt.

Basophilen Erythroblast BE mit erheblich kleinerem, grobscholliger strukturiertem Kern und radiär angeordnetem Chromatin. Der Cytoplasmasaum zeichnet sich stark basophil ab.

Polychromatischen Erythroblast PE, der im Kern radspeichenartig strukturiertes Chromatin, jedoch keine Nucleolen mehr besitzt. Die Farbe des Cytoplasma variiert nach Reifungsgrad durch progressive Hämoglobinisierung zwischen grauviolett und graurosa.

Oxyphilen Erythroblast OE, dessen Kern noch strukturiert ist und dessen homogenes Cytoplasma durch vollständige Hämoglobinisierung zart rosa erscheint.

Reifen Erythroblast RE mit strukturlosem, pyknotischem, dunkelviolettem Kern, der im Plasma meist exzentrisch liegt. Sein Cytoplasma entspricht der Farbe der Erythrozyten, mitunter auch der polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten.

B: Bei der Granulopoese werden folgende Zellen unterschieden (7):

Der Myeloblast MB, die jüngste Zelle der weißen Reihe ähnelt im Kern dem Proerythroblasten, die dichte und feinmaschige Chromatinstruktur erscheint beim Myeloblasten jedoch verwischener. Häufig treten 2-3 Nucleolen hervor. Der Cytoplasmasaum ist schwächer basophil als beim Proerythroblasten und jede Granulation fehlt noch.

Der Promyelocyt PM ist die größte Zelle der Granulopoese mit

groben, dunkelvioletten Granula im relativ breiten, zart basophilen Cytoplasmasaum. Der Kern ist häufig oval oder leicht eingebuchtet, Nucleolen sind im panoptisch gefärbten Präparat kaum noch zu erkennen.

Der neutrophile Myelocyt MC mit erheblich kleinerem Zelldurchmesser als bei dem Promyelocyten läßt keine azurophile Granulation mehr erkennen. Das Cytoplasma erscheint hellgrau bis zartrosa. Der Kern ist rundoval, häufig auch leicht eingebuchtet und zeigt ein verdichtetes Chromatingerüst.

Eosinophile und basophile Myelocyten besitzen gegenüber den neutrophilen eine so grobe eosinophile bzw. basophile Granulation, daß sich Kern und Plasma kaum noch abzeichnen.

Der Metamyelocyt MM oder jugendliche Granulocyt zeigt einen stark eingebuchteten Kern mit dichter, grobscholliger Chromatinstruktur. Cytoplasma und Granulation ähneln denen der Myelocyten.

Der stabkernige Granulocyt StG hat einen gebogenen grobscholligen Kern, dessen Stabform gelegentlich Einschnürungen aufweist, die jedoch nicht mehr als $\frac{1}{3}$ des Kerndurchmessers ausmachen dürfen.

Der neutrophile segmentkernige Granulocyt SG muß im fast strukturlosen Kern mindestens eine fadenförmige Brücke zwischen den Segmenten besitzen. Gewöhnlich entstehen 3-4 über Chromatinbrücken verbundene Segmente.

Eosinophile und basophile segmentkernige Granulocyten enthalten meist nur zwei Segmente, die von stark eosinophilen bzw. basophilen Granula überdeckt werden.

In der Auswertung werden basophile und eosinophile Myelocyten, stab- bzw. segmentkernige Granulocyten zu den entsprechenden neutrophilen Zelltypen gerechnet.

Die Abgrenzung der kontinuierlich ablaufenden Mitosen erfolgt nach BOLL (9) in 6 verschiedenen Phasen:

1. Prophase P: Kernmembran und Nucleolen sind aufgelöst, die Chromosomen werden als breite, ungeordnete Bälkchen in festem Spirem sichtbar.
2. Frühe Metaphase fM: Im lockeren Spirem liegen die Chromosomen noch immer ungeordnet über die Zelle verteilt.
3. Späte Metaphase sM: Die Chromosomen ordnen sich in diesem Stadium der Äquatorialplatte bzw. des Monasters.
4. Anaphase A: Im Diaster sind die Chromosomen in zwei Gruppen angeordnet.
5. Telophase T: Mit der Einschnürung des Zellplasmas bilden die Chromosomen ein lockeres Dispirem.
6. Rekonstruktionsphase R: Zwischen den beiden Tochterzellen ist gelegentlich noch eine dünne Plasmabrücke erkennbar, Kernmembran und Nucleolen sind noch nicht wieder ausgebildet. In beiden Zellen liegen die Chromosomen in festem Dispirem.

Aus den Zählergebnissen werden Tabellen von Mitose- und G/E-Indices, ferner Reifungskurven und karyologische Kurven aufgestellt. Als Mitoseindex wird die Zahl der Mitosen pro Zahl teilungsfähiger Zellen, in Promille ausgedrückt, verstanden (7) und getrennt für Erythropoese und Granulopoese errechnet. Das Verhältnis der Granulo- zur Erythropoese ergibt den G/E-Index.

Zu den teilungsfähigen Zellen zählen in der Erythropoese sämtliche Zellklassen mit Ausnahme der reifen Erythroblasten, in der Granulopoese die Granuloblasten vom Myeloblasten bis zum Metamyelocyten. Da die Cytoplasmaidentität von reifen Myelocyten und Metamyelocyten nur selten eine Unterscheidung in den Mitosen beider Zellklassen zulässt, werden die Metamyelocyten den Myelocyten zugeordnet. In den Reifungskurven wird

die prozentuale Verteilung der Zellformen graphisch dargestellt, während die karyologischen Kurven die prozentuale Mitosephasenverteilung wiedergeben.

In den Reifungskurven bedeuten: (Abb. 1 bis 8)

————— Kontrollkulturen ohne Zusatz
— — — — — Kulturen mit 1,5 mg% Folsäure
----- Kulturen mit 0,15 mg% Folsäure

Die Zahl der insgesamt ausdifferenzierten Zellen beträgt
76 829.

Folgende Patienten werden zur Untersuchung ausgewählt:

Fall I: Patientin L. M., geb. 4.10.96

Diagnose: Gallensteinileus, Cholecystitis, Cholelithiasis.

Knochenmarkdiagnose: Kein Anhalt für megaloblastische Anämie
wie bei dekompensiertem Morbus Biermer.

Blutbild: 16.7.65

Erythrocyten	4,2 Mill/ mm ³	Leukocyten	9 300 / mm ³
Hb	14,8g%	Eos	2 %
Hb _E	34 γγ	Stab	4 %
		Segm	42 %
		Lymph	49 %
		Mono	3 %

Fall II: Patientin K. M., geb. 21.12.96, Aufnahme: 3.8.65

Diagnose: Eosinophilie, Divertikulosis, Herzinsuffizienz und
Schulterversteifung.

Knochenmarkdiagnose: Bis auf Eosinophilie normales Mark.

Therapie vor der Sternalpunktion (23.8.65):

Digilong 4 x 1 Tbl., Muskeltrancopal 3 x 1 Drag.,
Combycym 3 x 2 D.

Blutbild: 17.8.65

Erythrozyten	6,02 Mill/ mm ³	Leukocyten	15 800 / mm ³
Hb	18,4 g%	Eos	5 %
Hb _E	31 γγ	Prom	1 %
		Stab	2 %
		Segm	64 %
		Lymph	23 %
		Mono	5 %

Fall III: Patientin W. W., geb. 7.6.03, Aufnahme: 6.5.65

Diagnose: Essentieller Hypertonus, Durchblutungsstörung beider Beine und Polycythämie - Verdacht.

Knochenmarkdiagnose: Kein Anhalt für Polycythämie.

Therapie vor der Sternalpunktion (17.5.65):

Lasix j.2.Tag 1 Tbl., Ronicol retard 2 x 1 Drag/die,
Hydergin 3 x 20 Tr./die, Lanicor 3 x 1 Tbl./die,
Sedaraupin 3 x 0,2 mg Tbl/die, Novalgin 2 x 1 Tbl/die.

Blutbild: 7.5.65

Erythrocyten	5,94 Mill/ mm ³	Leukocyten	11 000 / mm ³
Hb	15,9 g%	Eos	1 %
Hb _E	27 γγ	Stab	2 %
		Segm	49 %
		Lymph	39 %
		Mono	9 %

Fall IV: Patientin M. G., geb. 23.10.86, Aufnahme: 11.5.65

Diagnose: Panmyelopathie, splenomegale Markhemmung bei Leberzirrhose, Aszites u. Oesophagusvarizen, dekompensierte Myodegeneratio cordis.

Knochenmarkdiagnose: Reaktive Retikulose.

Therapie vor der Sternalpunktion (18.5.65):

Cardiaca, Combyzym 3 x 2 Drag.

Blutbild: 12.5.65

Erythrocyten	3,94 Mill/mm ³	Leukocyten	2 500 / mm ³
Hb	7,2 g%	Bas	1 %
Hb _E	18 γγ	Eos	5 %
		Stab	12 %
		Segm	32 %
		Lymph	43 %
Thrombo	95 000 / mm ³	Mono	7 %

Fall V: Patientin M.R., geb. 17.12.92, Aufnahme: 10.7.65

Diagnose: Ca-Anämie, Colon-Carcinom, Myocardinfarkt.

Knochenmarkdiagnose: Angeregte Granulopoese mit toxischer Granulation wie bei akutem Infekt. Die Plasmazellvermehrung spricht auch für infektiöse Erkrankung. Keine Tumorzeichen.

Therapie vor der Sternalpunktion (27.7.65):

Mixt. peps. 3 x 1 Eßl./die, Paraxin i.m. 2,0 g,
Spasmolytika, Antibiotika und Analgetika.

Blutbild: 27.7.65

Erythrocyten	2,77 Mill/mm ³	Leukocyten	15 600 / mm ³
Hb	7,0 g%	Eos	1 %
Hb _E	25 γγ	Meta	1 %
		Stab	46 %
		Segm	38 %
		Lymph	10 %
		Mono	4 %

Fall VI: Patientin E.D., geb. 19.4.01, Aufnahme: 5.9.65

Diagnose: Ca-Anämie, Adenocarcinom (Coecum - Colon ascend.)

Knochenmarkdiagnose: Vermehrte Erythropoese wie bei Hämolyse oder Blutungsanämie. Die Verminderung der Sideroblasten spricht für einen Eisenmangel, die Eosinophilie für eine allergische Reaktion.

Therapie vor der Sternalpunktion (20.9.65):

Cardiaca, Analgetika, Kobalt-Ferrlecit 3 x 30 Tr.

Blutbild: 10.9.65

Erythrocyten	3,35 Mill/ mm ³	Leukocyten	9 900 / mm ³
Hb	7,5 g%	Eos	4 %
Hb _E	23 γγ	Stab	2 %
		Segm	73 %
		Lymph	13 %
Thrombo	355 000/mm ³	Mono	8 %

Fall VII: Patient M.B., geb. 7.8.81

Diagnose: Panmyelopathie

Knochenmarkdiagnose: Sideroachrestische Anämie

Therapie vor der Sternalpunktion (19.5.65):

Novadral, Strophanthin, Cordalin, Ferrlecit.

Blutbild: 24.5.65

Erythrocyten	2,54 Mill/ mm ³	Leukocyten	1 950 / mm ³
Hb	9,5 g%	Bas	2 %
Hb _E	28,5 γγ	Eos	3 %
		Stab	10 %
		Segm	28 %
		Lymph	52 %
Thrombo	68 000 / mm ³	Mono	5 %

Fall VIII: Patient O.L., geb. 4.5.91, Aufnahme: 12.3.65

Diagnose: Akuter Myeloblastenschub bei chronischer Myelose

Knochenmarkdiagnose: Myeloblasten-Leukämie

Therapie vor der Sternalpunktion (19.5.65):

Ultracorten 15 mg, Prosplen 3 x 30 Tr., Colcemid 2 mg,

Birutan 3 x 1 Tbl., Primobolan 3 x 1 Tabl.,

Cal-C-Vita, Binotal.

Blutbild: 19.5.65

Erythrocyten	3,28 Mill/ mm ³	Leukocyten	5 500 / mm ³
Hb	11,6 g%	Eos	1 %
Hb _E	35 γγ	Mybl	25 %
		Prom	1 %
		Meta	2 %
		Stab	17 %
		Segm	31 %
		Lymph	19 %
		Parabl	4 %
Thrombo	25 000 / mm ³		

In den karyologischen Kurven der Mitosephasenverteilung (Abb. 9) bedeuten:

————— = Mitosen in Kontrollkulturen

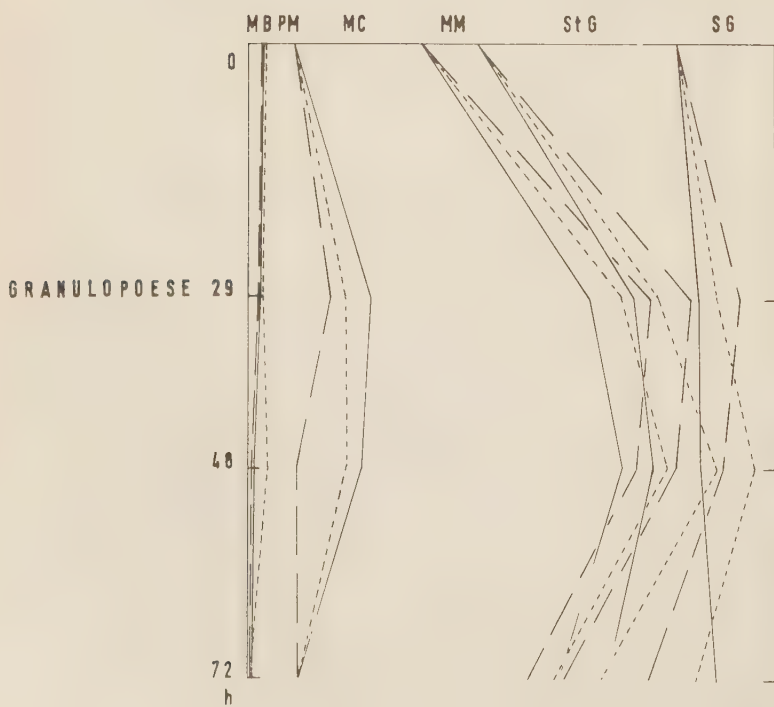
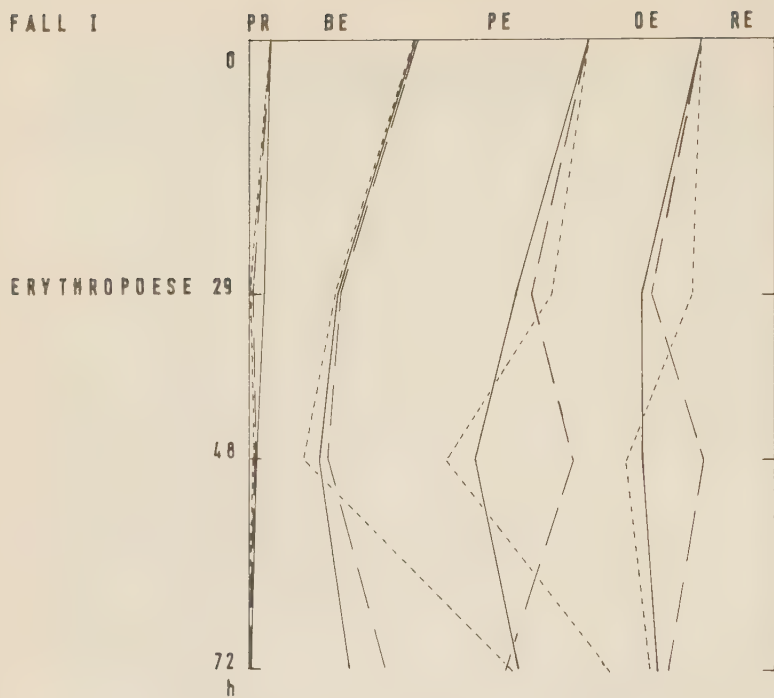
1. Erythropoese: 99 Mitosen

2. Granulopoese: 138 "

— — — — — = Summe der Mitosen in den Folsäurekulturen

1. Erythropoese: 210 Mitosen

2. Granulopoese: 156 "



FALL II

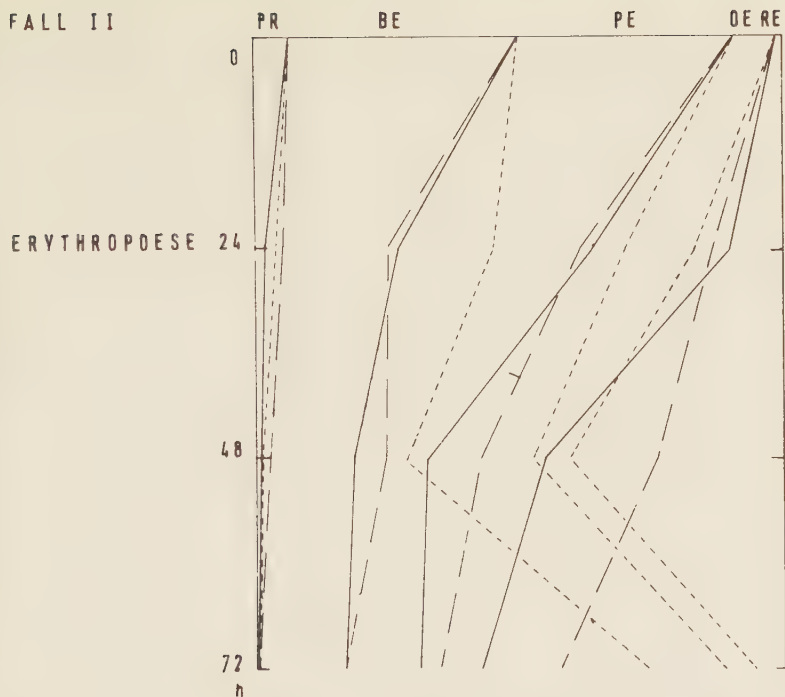
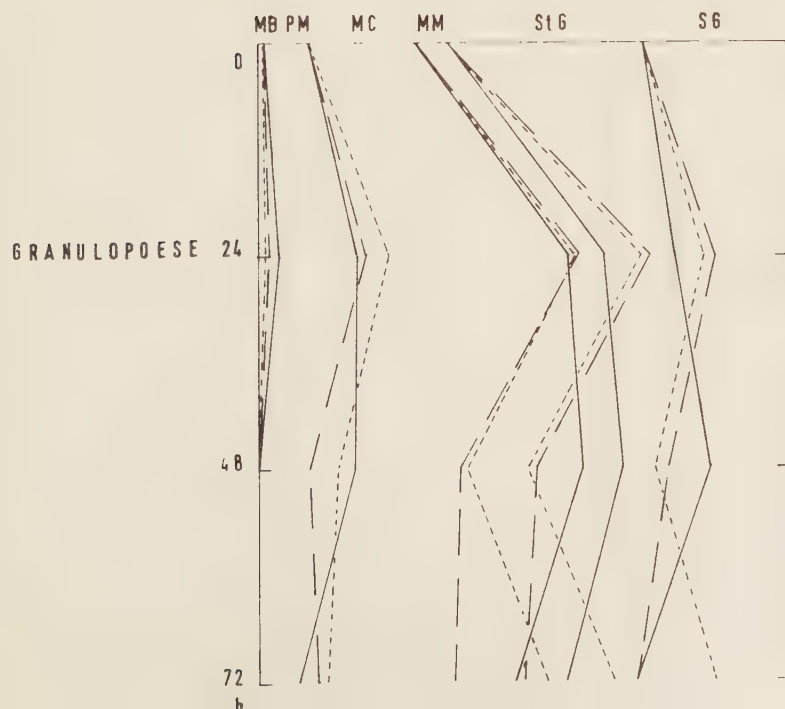


Abb. 2



FALL III

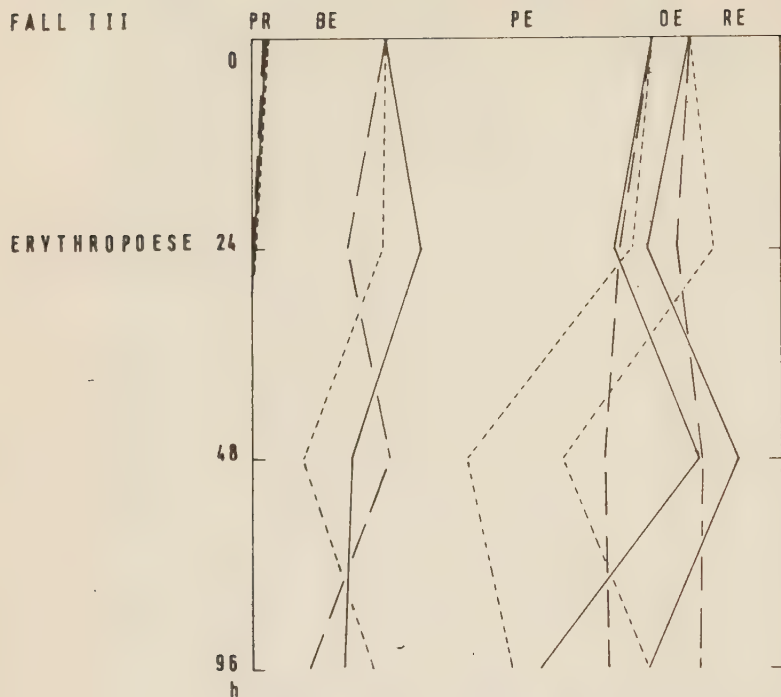
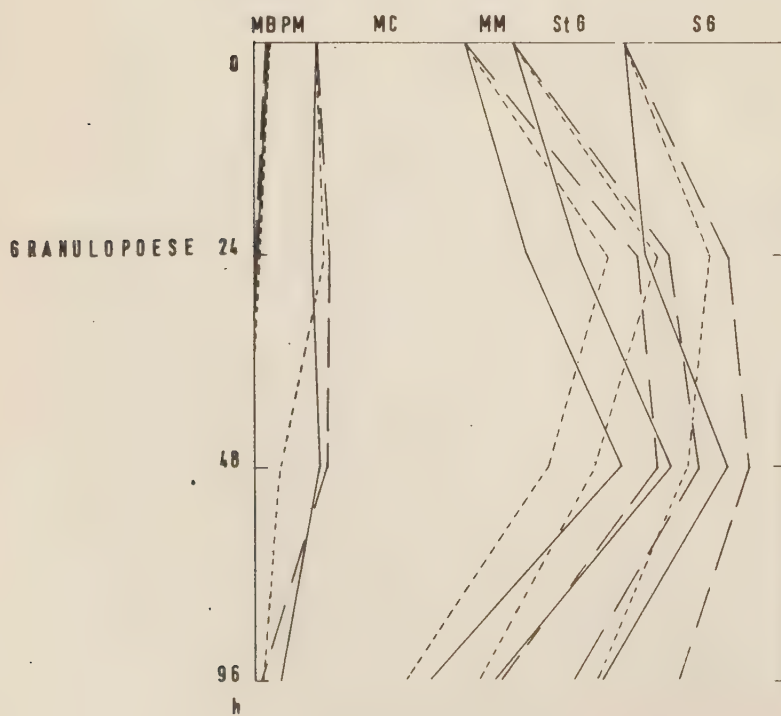
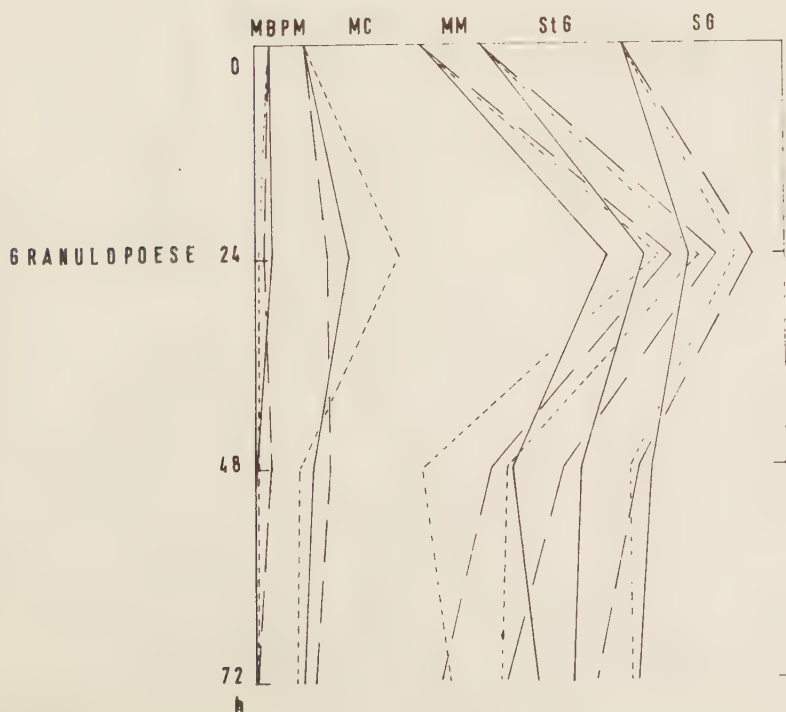
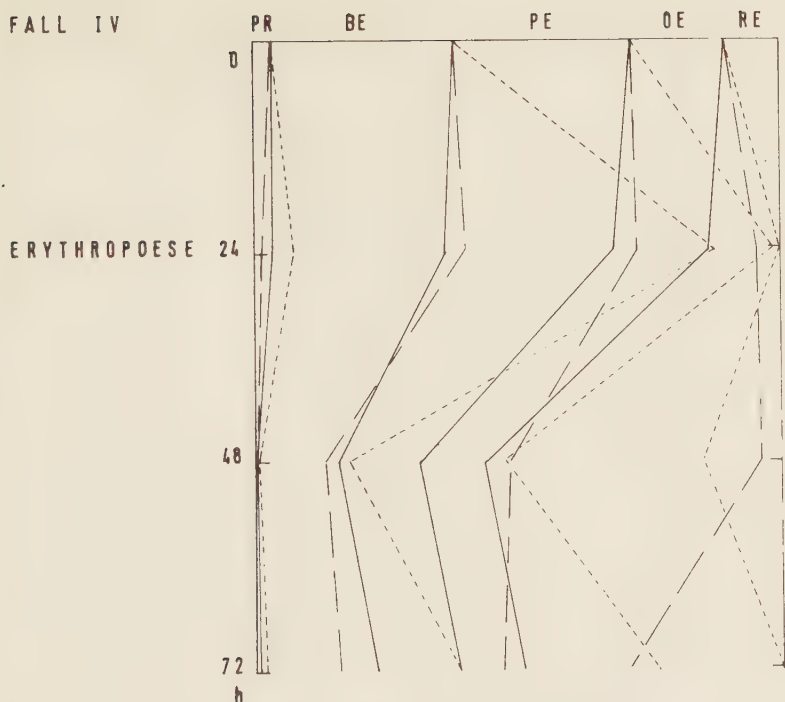


Abb. 3



FALL IV

Abb. 4



FALL V

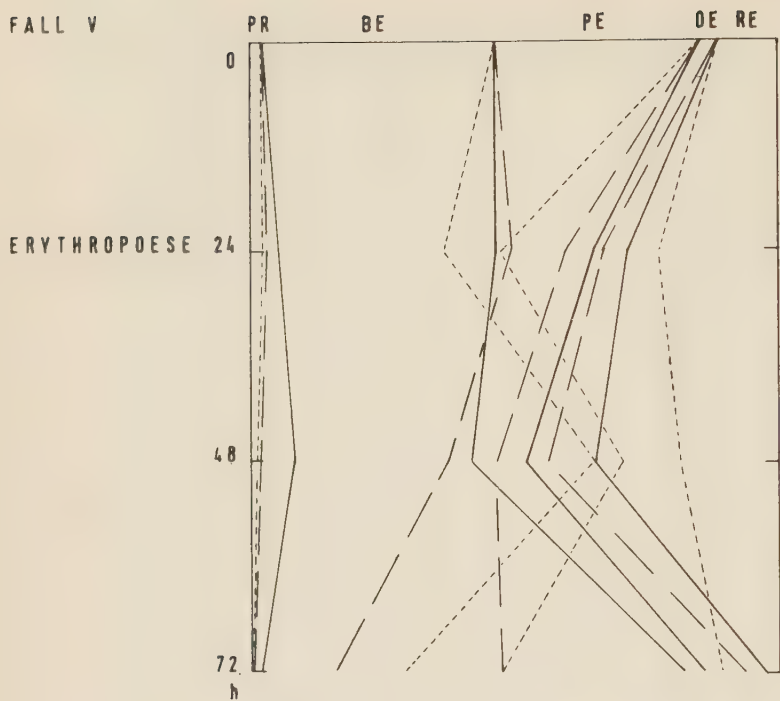
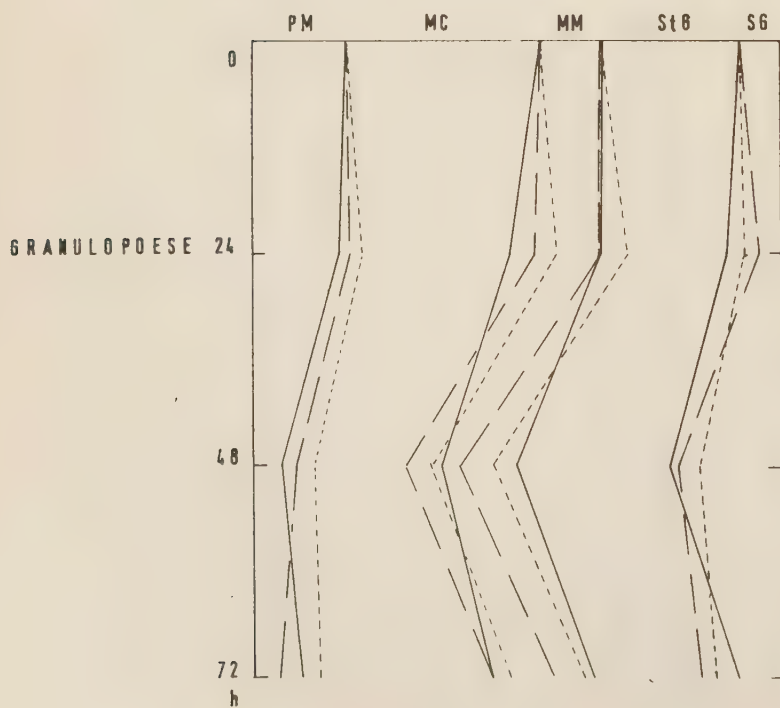
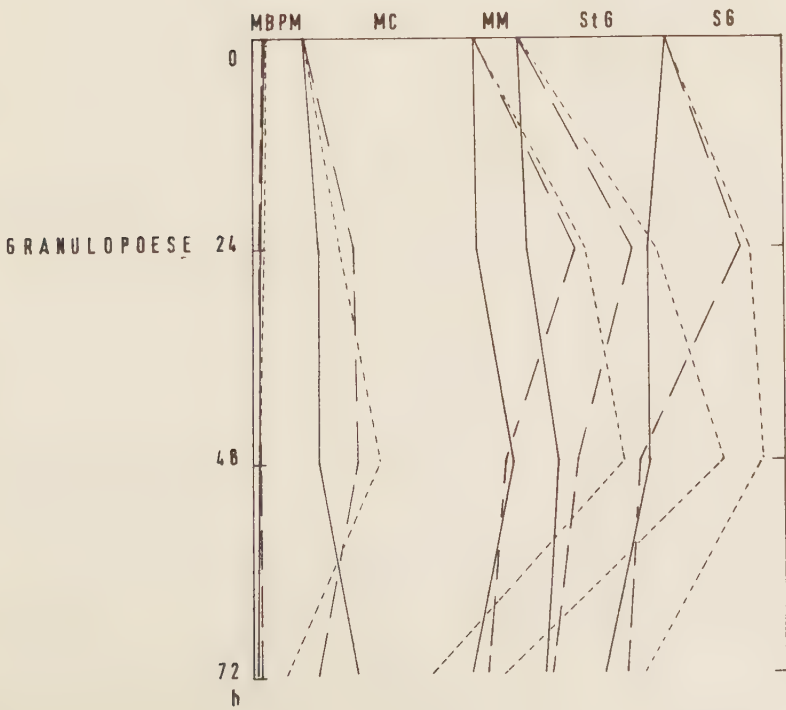
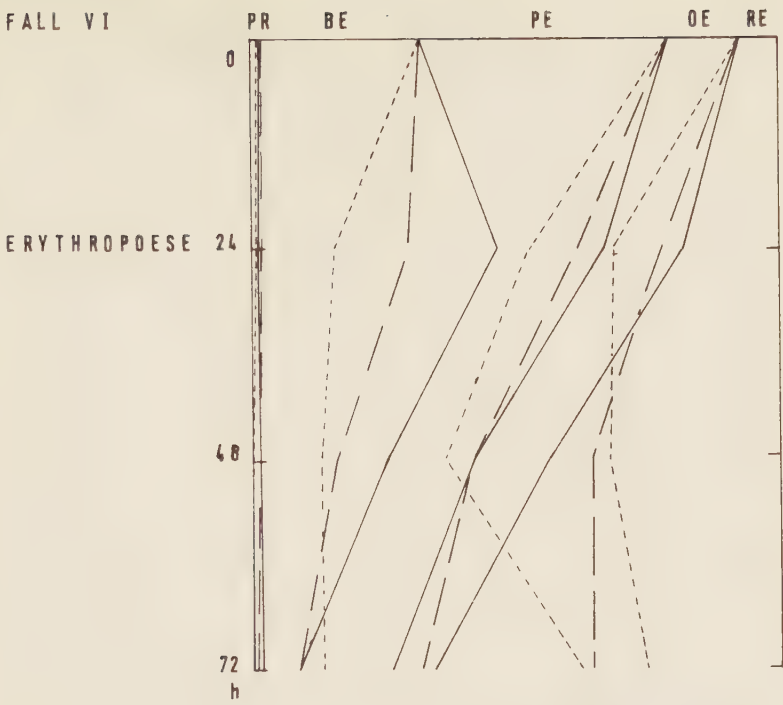


Abb. 5



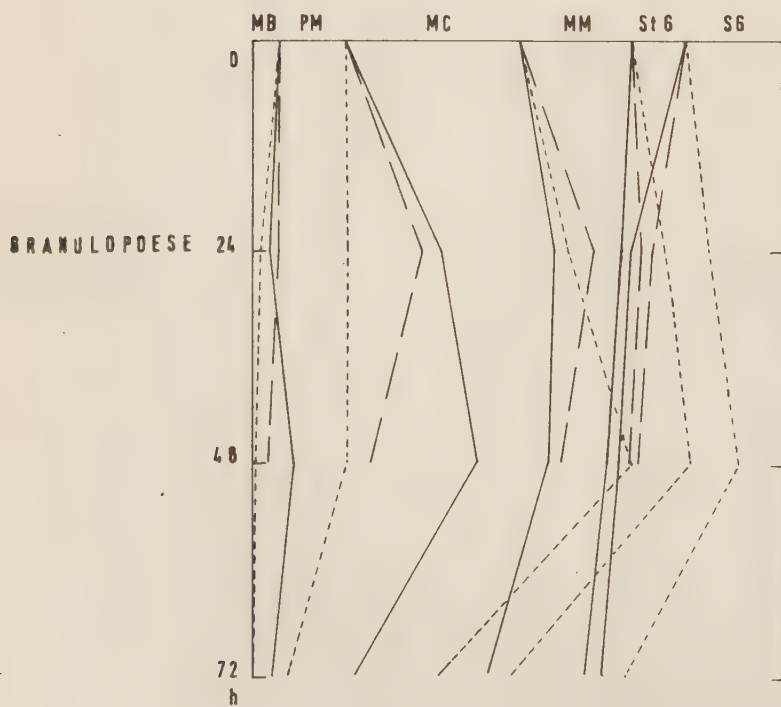
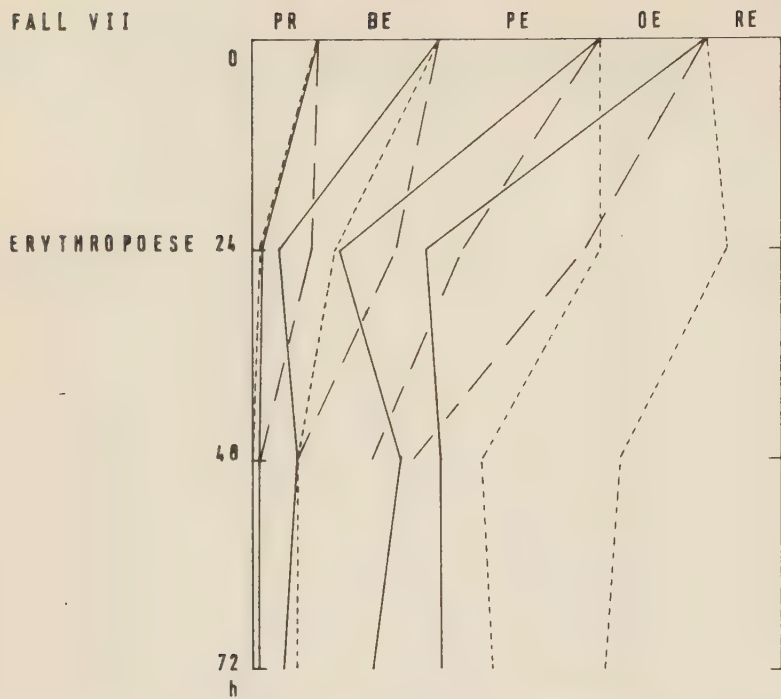
FALL VI

Abb. 6



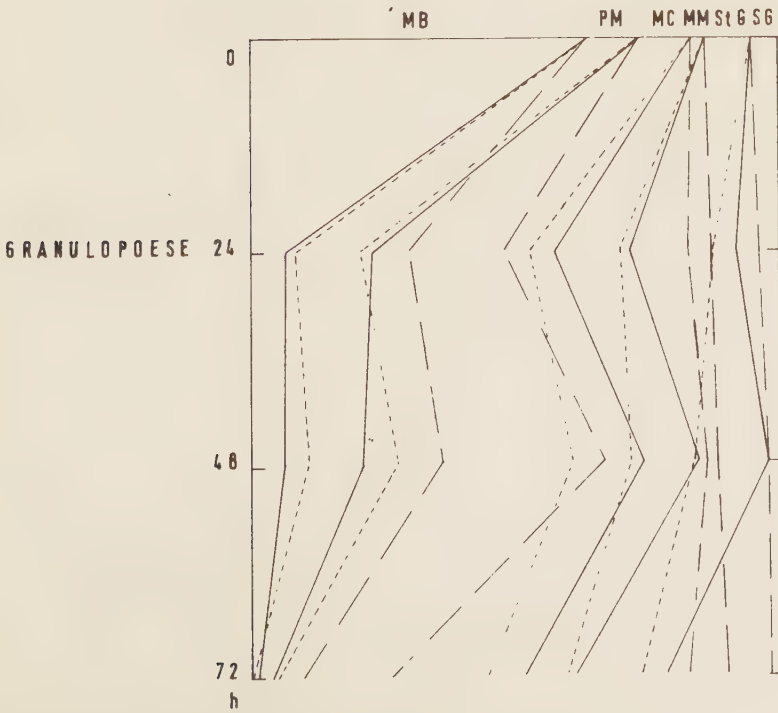
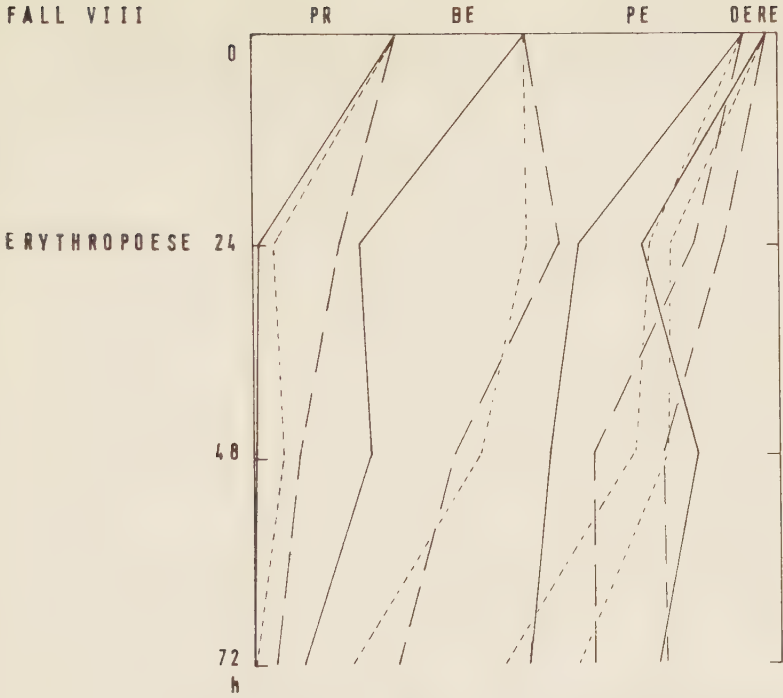
FALL VII

Abb. 7

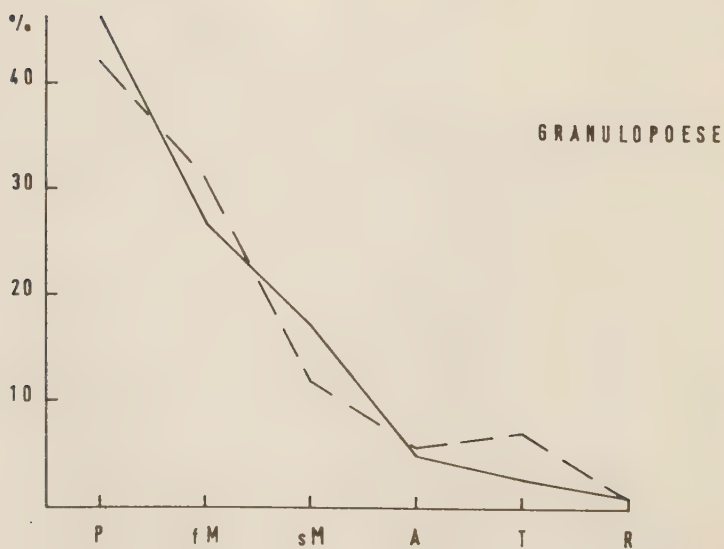
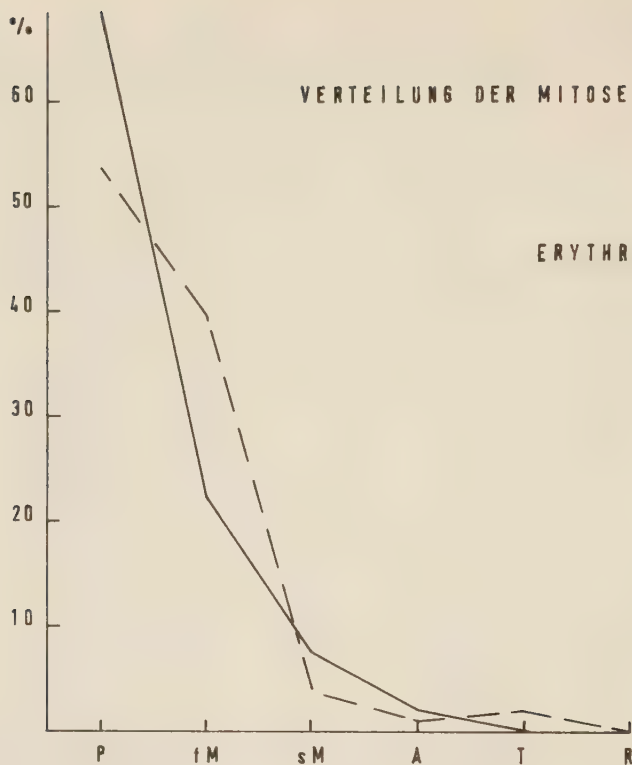


FALL VIII

Abb. 8



VERTEILUNG DER MITOSEPHASEN



Nach einem optischen Vergleich graphischer Darstellungen der differenzierten Zellformen erscheint in der Erythropoese eine Signifikanzberechnung notwendig. Mit Hilfe des χ^2 -Tests nach PEARSON wird die Signifikanz von je 2 Zählreihen bestimmt, wobei folgende Bezeichnungen angewandt werden (23):

a = Zellzahl der Kulturen mit Folsäurezusatz

b = Zellzahl in den Kontrollkulturen

$$m = \frac{a + b}{2} \quad (\text{Erwartungswert})$$

Differiert die Summe der Zellzahlen der Reihe a von der Summe der Zellzahlen der Reihe b erheblich, so wird der Faktor

$$\frac{\text{Summe a}}{\text{Summe a} + \text{Summe b}}$$

bestimmt, der dann mit der Summe (a + b) multipliziert wird.

$\triangle$ = Differenz a - m (absoluter Wert)

$$\chi^2 = \text{Summe der Einzelergebnisse } \frac{\triangle^2}{m}$$

χ^2 ist eine Maßzahl für die Übereinstimmung oder Nichtübereinstimmung der verglichenen Zahlenreihen.

Wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% angenommen, liegt die Signifikanz bei den 5 Zellformen der Erythropoese bei $\chi^2 = 13$. Bei 8 Parametern liegt die Signifikanz mit gleicher Irrtumswahrscheinlichkeit bei $\chi^2 = 18$. In den Tabellen werden nur die Endreihen $\frac{\triangle^2}{m}$ und deren Summen χ^2 angegeben.

Tabelle 1: Werte der Signifikanzberechnungen für die Reifungskurven der Erythropoese.

	Zell- typ	Folsäure 1,5 mg%			Folsäure 0,15 mg%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Fall I	PE	1,80	0,25	0,00	1,50	0,14	-
	bE	0,69	8,21	0,96	0,26	0,52	8,16
	pE	0,39	4,21	0,50	1,32	0,10	1,80
	oE	0,00	0,06	0,26	0,40	0,08	4,56
	rE	0,02	1,80	0,00	2,89	0,19	0,06
	χ^2	2,90	<u>14,53</u>	1,72	6,37	1,03	<u>14,58</u>
Fall II	PE	2,08	0,17	1,00	0,67	0,50	1,00
	bE	0,48	0,42	0,02	6,72	1,93	41,60
	pE	0,08	0,52	0,68	3,17	2,86	0,00
	oE	0,12	1,68	3,88	6,03	7,26	2,25
	rE	0,41	6,07	2,12	3,33	0,21	42,40
	χ^2	3,17	8,86	7,70	<u>19,92</u>	12,76	<u>87,25</u>
Fall III	PE	0,00	0,00	-	-	-	1,00
	bE	4,16	8,48	0,06	3,20	0,40	1,12
	pE	5,96	0,17	5,39	0,21	2,72	1,94
	oE	3,11	15,62	0,14	4,17	16,49	0,65
	rE	0,50	5,93	3,03	8,81	47,10	10,39
	χ^2	13,73	<u>30,20</u>	8,62	<u>16,39</u>	<u>66,71</u>	<u>15,10</u>
Fall IV	PE	0,80	1,00	0,00	3,60	0,00	1,00
	bE	1,25	0,74	0,03	55,65	0,20	14,05
	pE	0,00	16,50	4,17	18,45	10,11	8,89
	oE	1,36	44,48	4,03	24,30	28,45	3,77
	rE	8,52	71,90	6,95	23,00	43,70	34,00
	χ^2	11,93	<u>134,62</u>	<u>15,18</u>	<u>125,00</u>	<u>82,46</u>	<u>61,71</u>

	Zell- typ	Folsäure 1,5 mg%			Folsäure 0,15 mg%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Fall V	PE	0,20	4,00	-	0,44	4,17	1,00
	bE	1,50	0,75	38,10	0,28	3,44	18,72
	pE	0,74	0,00	8,88	1,16	1,60	3,71
	oE	0,27	0,06	11,15	5,69	0,29	12,25
	rE	1,29	2,20	1,39	0,27	4,50	3,06
	χ^2	4,00	7,01	<u>59,52</u>	7,84	<u>14,00</u>	<u>38,74</u>
Fall VI	PE	0,17	0,50	0,25	0,33	2,00	2,00
	bE	5,41	2,04	0,05	20,35	4,05	2,38
	pE	2,79	2,24	0,13	4,96	1,16	13,91
	oE	0,06	2,58	14,80	0,02	6,02	1,06
	rE	0,28	0,81	10,41	3,54	2,05	22,21
	χ^2	8,71	8,17	<u>25,64</u>	<u>29,20</u>	<u>15,28</u>	<u>41,56</u>
Fall VII	PE	12,00	0,00	-	0,00	1,00	2,00
	bE	15,61	0,22	-	18,17	0,00	1,88
	pE	0,00	0,10	-	58,80	10,68	16,48
	oE	1,76	0,22	-	4,02	24,90	4,52
	rE	23,85	1,24	-	76,25	18,77	2,46
	χ^2	<u>53,22</u>	1,78	-	<u>157,24</u>	<u>55,35</u>	<u>27,34</u>
Fall VIII	PE	42,05	17,28	4,46	8,33	10,71	-
	bE	13,70	8,02	5,33	37,70	22,62	2,76
	pE	19,89	4,28	0,61	0,06	1,49	3,08
	oE	8,65	0,39	3,42	13,01	0,91	3,16
	rE	29,00	7,15	0,10	2,47	8,17	4,08
	χ^2	<u>113,29</u>	<u>37,12</u>	<u>13,92</u>	<u>61,57</u>	<u>43,90</u>	<u>13,08</u>

Aus der Tabelle 1 ergeben sich bei einem Zusatz von 1,5 mg% Folsäure 11, bei einem Zusatz von 0,15 mg% Folsäure 20 signifikante Ergebnisse. Es liegt demnach bei einem Zusatz von 0,15 mg% Folsäure eine ca. doppelt so häufige Signifikanz wie bei einem Zusatz von 1,5 mg% Folsäure vor.

Tabelle 2: G/E - Indices

	Ori- ginal	Kontrolle			Folsäure 1,5 mg%			Folsäure 0,15 mg%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Fall I	6,60	2,76	3,37	7,25	2,27	2,37	5,93	2,89	1,62	9,56
II	4,85	1,82	4,45	3,29	1,71	2,28	2,02	3,08	4,44	4,96
III	4,38	2,04	2,88	2,40	1,73	1,61	5,26	2,56	1,61	1,25
IV	0,58	0,58	1,23	2,96	2,17	2,17	2,42	1,47	1,90	6,55
V	8,70	7,34	6,16	3,78	5,30	5,36	1,62	2,62	7,66	3,00
VI	3,39	2,66	2,86	3,27	1,64	2,80	2,21	1,44	1,02	1,96
VII	1,20	1,07	0,70	1,30	1,70	0,69	-	2,16	1,55	1,45
VIII	3,46	0,50	1,00	2,94	0,60	0,50	0,96	0,56	0,38	1,03
Summe	33,16	12,77	22,65	27,19	17,12	17,78	20,42	16,78	20,18	29,76
Arith. Mittel	4,15	2,35	2,83	3,40	2,14	2,22	2,92	2,10	2,52	3,72

Tabelle 3: Signifikanzberechnungen der G/E-Indices nach dem χ^2 -Test.

	Folsäure 1,5 mg%			Folsäure 0,15 mg%		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Fall I	0,02	0,09	0,07	0,00	0,30	0,16
II	0,00	0,35	0,15	0,16	0,00	0,17
III	0,01	0,18	0,53	0,03	0,18	0,18
IV	0,04	0,13	0,00	0,20	0,07	0,68
V	0,16	0,03	0,43	1,12	0,08	0,05
VI	0,12	0,00	0,10	0,18	0,43	0,16
VII	0,05	0,00	0,65	0,19	0,16	0,01
VIII	0,01	0,08	0,50	0,00	0,14	0,46
χ^2	0,41	0,86	2,43	1,38	1,36	1,87

Tabelle 4: Mitoseindices der Erythropoese (in Promille)

	Ori- ginal	Kontrolle			Folsäure 1,5 mg%			Folsäure 0,15 mg%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Fall I	48,0	55,3	56,6	11,4	35,4	22,2	20,6	42,4	30,3	34,5
II	6,4	13,4	0,0	18,8	27,5	4,5	18,7	0,0	0,0	0,0
III	7,1	22,3	43,0	4,9	30,1	13,4	0,0	31,0	13,8	9,3
IV	16,2	7,8	31,7	50,9	11,1	18,2	56,6	49,8	29,9	0,0
V	0,0	25,6	12,4	6,5	33,3	11,8	6,5	20,9	11,1	5,2
VI	5,3	9,8	28,8	13,2	27,6	67,5	41,6	45,8	43,1	4,2
VII	17,6	27,5	0,0	0,0	31,0	13,2	-	33,6	37,0	31,1
VIII	5,1	2,2	2,5	47,5	6,5	6,7	0,0	0,0	8,5	0,0
Summe	105,7	163,9	175,0	153,2	202,5	157,5	144,0	223,5	173,7	84,3
Arith. Mittel	13,2	20,5	21,9	19,2	25,3	19,7	18,0	28,0	21,7	10,5

Tabelle 5: Signifikanzberechnungen zur Tabelle 4 nach dem χ^2 -Test.

		Folsäure 1,5 mg%			Folsäure 0,15 mg%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Fall I		2,16	7,51	1,32	0,84	3,61	5,86
II		2,32	2,30	0,00	6,70	-	9,40
III		0,58	7,76	2,30	0,73	7,50	6,09
IV		0,30	1,79	0,16	15,31	0,03	25,30
V		0,52	7,80	0,00	0,23	0,03	0,06
VI		4,23	0,00	7,36	11,64	1,44	2,33
VII		0,11	6,60	-	0,31	18,50	15,60
VIII		1,10	0,96	23,61	1,10	1,64	23,60
χ^2	2	11,32	34,72	34,75	36,86	32,75	88,24

Tabelle 6: Mitoseindices der Granulopoese (in Promille)

	Ori- ginal	Kontrolle			Folsäure 1,5 mg%			Folsäure 0,15 mg%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Fall I	56,0	24,4	16,4	14,4	20,3	8,1	16,3	17,8	19,6	12,4
II	22,0	7,9	5,4	7,2	7,2	6,0	6,2	7,8	12,1	9,0
III	5,5	2,7	3,9	0,0	6,7	4,2	2,1	2,0	5,6	8,7
IV	22,1	15,6	3,1	9,8	13,9	17,2	15,7	11,0	12,0	11,8
V	7,4	22,7	20,8	8,0	2,1	18,9	9,8	8,3	10,6	12,4
VI	8,7	0,0	0,0	7,4	10,5	9,3	2,7	7,2	16,0	0,0
VII	5,8	12,1	9,3	0,0	18,7	32,6	-	25,9	2,2	0,0
VIII	26,8	9,4	5,2	0,0	0,0	11,2	0,0	0,0	6,1	0,0
Summe	154,3	94,8	64,1	46,8	79,4	107,5	52,8	80,5	84,2	54,3
Arith. Mittel	19,3	11,8	8,0	5,9	9,9	13,4	6,6	10,1	10,5	6,8

Tabelle 7: Signifikanzberechnungen zur Tabelle 6 nach dem χ^2 -Test.

	Folsäure 1,5 mg%			Folsäure 0,15 mg%		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Fall I	0,18	1,36	0,06	0,52	0,14	0,07
II	0,01	0,02	0,04	0,00	1,31	0,10
III	0,85	0,01	1,10	0,04	0,17	4,40
IV	0,04	4,94	0,70	0,40	2,02	0,09
V	8,56	0,04	0,09	3,01	1,65	0,48
VI	5,30	4,70	1,04	3,60	8,00	3,70
VII	0,71	6,52	-	2,50	2,11	-
VIII	4,70	1,10	-	4,70	0,03	-
χ^2	<u>20,35</u>	<u>18,69</u>	3,03	14,77	15,43	8,84

III. Ergebnisse.

Die Differentialzählungen der von uns untersuchten 8 Fälle werden in Reifungskurven (Abb. 1 bis 8) graphisch dargestellt und nach vorliegenden hämatologischen Erkrankungen zusammengefaßt. In den Kurven der Erythro- und Granulopoese sind auf der Abszisse die Zellarten in prozentualer Verteilung und auf der Ordinate die Bebrütungszeiten der Kulturen eingetragen. Als Maßstab für die Beurteilung der Ergebnisse gelten die Reifungskurven der normalen Hämatopoese nach BOLL (7, 13).

A. Erythropoese:

1. Kontrolle.

Betrachten wir die Zellverteilung im Originalausstrich, so wird in allen 8 Fällen eine leichte Linksverschiebung mit besonders hohem Anteil der basophilen Erythroblasten sichtbar. Bei den Patienten VII und VIII fällt eine prozentuale Vermehrung der Proerythroblasten gegenüber einer Normalverteilung auf.

Nach 24stündiger Bebrütung zeichnet sich in den Kontrollkulturen generell eine Reifung der teilungsfähigen Erythroblasten ab. Eine gleichmäßige Ausdifferenzierung aller Zellklassen wird besonders in den Fällen I, II, IV, VII und VIII deutlich, wogegen III und VI eine Steigerung des basophilen und im Fall V des Proerythroblastenanteils ergeben. Die Vermehrung dieser unreifen Zellen vermindert ausschließlich den Prozentsatz der polychromatischen Blasten, so daß die Ausreifung insgesamt unbeeinflusst bleibt.

Etwas uneinheitlicher verlaufen die Kurven zur Zeit des Ausstrichs nach 48 Stunden. Während sich in den Versuchen II, IV und VI die Reifung gegenüber der 24-Stunden-Kultur verstärkt

fortgesetzt, kommt es in der überwiegenden Zahl der Fälle (I, III, V, VII und VIII) zur verzögerten Reifung mit zum Teil rückläufiger Tendenz. Diese Stagnation wird von einer Konstanz bzw. Zunahme der oxyphilen (außer Fall VII), in geringem Maße auch durch eine auffällige Vermehrung der polychromatischen Erythroblasten in den Versuchen III und VII bestimmt.

Die Neigung zur weiteren Ausreifung entspricht in der 72-Stunden-Kultur weitgehend den Kontrollen nach 24 Stunden, wenn auch im Fall V eine ungewöhnliche prozentuale Steigerung der basophilen Erythroblasten zur starken Linksverschiebung mit einem verschwindend kleinen Anteil reifer Zellen führt. Die abnorme Veränderung in der Knochenmarkkultur V kann eventuell auf eine hohe Anzahl Zelltrümmer im Ausstrichpräparat zurückgeführt werden, wobei sich die basophilen Erythroblasten als eine besonders resistente Zellgruppe manifestieren.

2. Zusatz von 1,5 mg% Folsäure.

Der Zusatz von 1,5 mg% Folsäure zur 24-Stunden-Kultur führt in den Fällen der relativ normalen Hämatopoese (I und II) nicht zu einer Veränderung gegenüber den Kontrollwerten, bei der Polyglobulie III mit fast normalem Markbefund zu einer gerade signifikanten Proerythroblastenausreifung mit Verminderung des Anteils basophiler Blasten (Tab. 1).

Die Kulturausstriche nach 48 Stunden ergeben in den Fällen I und II eine Linksverschiebung, die auf Grund des erhöhten Anteils basophiler und polychromatischer Erythroblasten signifikant ist. Die Polyglobulie III dagegen zeigt eine signifikante Reifungsbeschleunigung gegenüber den gehemmten Kontrollwerten, bleibt jedoch den 24 Stunden-Werten der Folsäure-Kultur ähnlich.

Eine weitere Linksverschiebung nach 72 Stunden bzw. im Fall III nach 96 Stunden ist statistisch nicht zu sichern.

Unbedeutende Abweichungen von den Kontrollwerten liegen bei der 24-Stunden-Kultur der Retikuloze IV und den beiden Ca-Anämien V und VI vor. Nach 48 Stunden setzt im Versuch IV eine erhebliche Linksverschiebung mit signifikant vermehrten polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten ein, die auch nach 72 Stunden trotz weiterer Ausreifung der teilungsfähigen Zellen bestehen bleibt. Während in der 48-Stunden-Kultur der Fälle V und VI keine deutliche Veränderung gegenüber der Kontrolle erkennbar ist, zeigen die 72-Stunden-Ausstriche unterschiedliche, signifikante Ergebnisse, Fall V spricht für eine Rechts-, Fall VI dagegen für eine Linksverschiebung.

In der Kultur nach 24 Stunden Bebrütung beobachten wir eine starke, signifikante Linksverschiebung aller Zellarten in den Fällen der sideroachrestischen Anämie VII und der Myeloblasten-Leukämie VIII. Die Linksverschiebung im letzteren Fall wird wesentlich durch eine Steigerung des Anteils basophiler Erythroblasten und einer verzögerten Ausreifung der Proerythroblasten bestimmt. Die 48-Stunden-Ausstriche zeigen eine verminderte, jedoch signifikante Linksverschiebung im Fall VIII, wogegen eine verstärkte Ausreifung im Fall VII keine signifikante Änderung zu den Kontrollwerten ergibt. Bei der Myeloblasten-leukämie bleibt die Vermehrung unreifer Zellformen nach 72 Stunden bestehen, wenn auch ein Vergleich der Summe teilungsfähiger Erythroblasten mit der Summe der Kontrollwerte nur unwesentliche Änderungen zeigt. Fall VII ist nach 72 Stunden Bebrütungsdauer nicht mehr auswertbar.

3. Zusatz von 0,15 mg% Folsäure.

Der Ansatz mit 0,15 mg% Folsäure ergibt in der 24- bzw. 29-Stunden-Kultur eine Linksverschiebung der Fälle I bis III, die jedoch nur in den Fällen II und III durch signifikante Werte bestätigt wird. Nach 48 Stunden setzt eine starke Ausreifung ein, die in der relativ normalen Hämatopoese zur Angleichung an die Werte der Kontrollkulturen führt, bei der Polyglobulie III jedoch eine signifikante Reifungsbeschleunigung bedingt. Durch Entkernung im letzten Fall werden besonders die polychromatischen Erythroblasten reduziert. Eine erneut einsetzende Linksverschiebung nach 72 Stunden beeinflusst signifikant die Ergebnisse der Versuche I und II, während es im Fall der Polyglobulie III wieder zu einer Annäherung an die Kontrollwerte kommt und wir nun von einer Reifungsverzögerung sprechen können.

Eine Reifungsarretierung mit starker prozentualer Vermehrung der basophilen Erythroblasten zeigt nach 24-stündiger Bebrütung die Kultur des retikulären Knochenmarks IV. Diese Vermehrung unreifer Zellformen bleibt auch nach 48 und 72 Stunden signifikant erkennbar, obwohl nach 48 Stunden eine erhebliche Rechtsverschiebung einsetzt.

Die Kulturen der Ca-Anämie V und VI zeigen nach 24 Stunden eine Ausreifung, die jedoch nur im Fall VI signifikant ist. Nach 48 und 72 Stunden verhalten sich die Reifungstendenzen beider Versuchsreihen konträr zueinander.

Gegenüber den Kontroll- und Zusatzkulturen mit 1,5 mg% wird mit 0,15 mg% Folsäure im Koagulum die Linksverschiebung des Falls VII nach 24 Stunden noch wesentlich verstärkt. Auffallend ist der hohe Anteil polychromatischer Erythroblasten. Auch im Fall der Myeloblastenleukämie VIII ist die Ausreifung nach 24 Stunden signifikant verzögert, wobei in diesem Fall

die Linksverschiebung durch die gesteigerte Zahl basophiler Erythroblasten zustande kommt. Nach 48 Stunden Bebrütung ist in beiden Versuchen eine signifikante Linksverschiebung erkennbar, die sich nach 72 Stunden im Fall VIII dem Kontrollwert nähert.

B. Granulopoese.

Die graphisch dargestellten Differentialzählungen zeigen nach 24-stündiger Kulturzeit eine Linksverschiebung sowohl nach Zugabe von 1,5 mg% als auch von 0,15 mg% Folsäure. Als einzige Ausnahme stellt sich die Kultur der sideroachrestischen Anämie VII dar, die lediglich im Promyelocytenanteil zur Reifungsbeschleunigung, in der Summe der Granuloblasten ebenfalls zur Reifungsverzögerung tendiert. Diese einheitlichen Ergebnisse lassen sich jedoch, von Einzelfällen abgesehen, statistisch nicht ausreichend sichern.

Im Gegensatz zur 24-Stunden-Kultur demonstrieren die Ausstriche nach 48 und 72 Stunden eine abwechslungsreiche Verteilung von Linksverschiebungen und Ausreifungen, die in der Mehrzahl der Fälle nur unbedeutend von den Kontrollergebnissen divergieren. Die Kultur nach 48 Stunden ist bei der sideroachrestischen Anämie VII entsprechend der 24-Stunden-Kultur auszuwerten. Eine deutliche Linksverschiebung zeigt der Folsäurezusatz 0,15 mg% nach 48-stündiger Bebrütung im Fall der Ca-Anämie VI. Eine verstärkte Rechtsverschiebung im 72-Stundenpräparat gleicht diese Reifungsverzögerung wieder aus. Die umgekehrten Verhältnisse finden wir in der Kultur einer relativ normalen Hämatopoese II vor. Die Myeloblastenleukämie VIII zeigt eine Linksverschiebung nach Folsäurezugaben in beiden Konzentrationen.

Allgemein erlaubt die Anwendung der Folsäure in beiden Konzentrationen auf die weiße Reihe keinen eindeutigen Schluß. Nach der graphischen Darstellung erscheinen abweichende Zellverteilungen in den Zusatzkulturen gegenüber den Kontrollwerten zufällig bedingt, so daß wir von allen weiteren Berechnungen absehen.

C. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Reifungskurven.

Unter Zusatz von 1,5 mg% Folsäure zur Knochenmarkkultur kommt es nach 24 Stunden hauptsächlich bei der sideroachrestischen Anämie VII und der Myeloblastenleukämie VIII zu einer signifikanten Linksverschiebung der Erythropoese, die bei der sideroachrestischen Anämie nach 48 und 72 Stunden erhalten bleibt. Die relativ normale Hämatopoese I und II, sowie die Retikuloze IV zeigen in den 48- und 72-Stunden-Ausstrichen eine Vermehrung der unreifen Zellen. Eine Reifungsbeschleunigung beobachtet man nur in der 72-Stunden-Kultur der Ca-Anämie V.

0,15 mg% Folsäure verzögert im 24-Stunden-Präparat die Reifung der Erythropoese aller untersuchten Fälle bis auf die Ca-Anämien V und VI. Nach 48 Stunden bleibt die Erythropoese des retikulären IV, sideroachrestisch anämischen VII und myeloleukämischen Knochenmarks VIII signifikant linksverschoben. In der 72-Stunden-Kultur sistiert die Reifung des Marks relativ normaler und retikulärer Hämatopoesen I, II und IV ebenfalls. Im Fall der sideroachrestischen Anämie VII und der Myeloblastenleukämie VIII nähern sich die Ergebnisse den Kontrollwerten. Eine Ausreifung lassen nur wenige Ausnahmen zu unterschiedlichen Kulturzeiten erkennen.

Die Granulopoese wird in den meisten Fällen kaum oder gar nicht beeinflusst, da weder eine eindeutige Linksverschiebung

noch eine Stimulierung bei den Zählergebnissen festgestellt werden kann.

D. G/E-Index (Tabellen 2 und 3):

Die Zahlenverhältnisse der weißen zur roten Reihe zeigen in den Originalausstrichen und Kulturen sehr unterschiedliche Werte. Vergleichen wir die arithmetischen Mittelwerte der G/E-Indices (Tabelle 2) des Sofortausstrichs mit denen der Kontroll- und Zusatzkulturen, so fällt eine markante Reduzierung mit der stärksten Abnahme in der 24-Stunden-Kultur auf. Nach 48 und 72 Stunden steigen die Indices zwar wieder an, erreichen jedoch in keinem Fall die der Originalwerte. Die Zusätze von 1,5 mg% und 0,15 mg% Folsäure vermindern die G/E-Indices außer in den 72-Stunden-Kulturen nach 0,15 mg% Folsäurezusatz unwesentlich. Statistische Berechnungen mit Hilfe des χ^2 -Tests ergeben zu keiner Kulturzeit signifikante Werte (Tabelle 3).

Den anfänglichen Abfall und allmählichen Anstieg der G/E-Indices drücken auch, abgesehen von den Fällen V und VII, die Einzelergebnisse aus. Die Werte der Ca-Anämie V zeigen eine fallende Tendenz sowohl in den gleichzeitigen Ausstrichen nach Folsäurezusatz, als auch in den Kulturpräparaten zu verschiedenen Zeiten. Die sideroachrestische Anämie VII ergibt zwar innerhalb der Einzelkulturen einen Abfall, in den vergleichbaren Kulturzeiten unter dem Einfluß der Folsäure jedoch wieder ansteigende Werte. Diese Änderungen im G/E-Index gehen zu Lasten der Erythropoese, deren Werte größeren Schwankungen unterliegen als die der Granulopoese.

E. Mitose-Index (Tabellen 4 bis 7):

Betrachten wir eine Zusammenstellung der Mitose-Indices zunächst in der roten Reihe (Tab. 4), so fällt gegenüber dem Originalausstrich ein allgemeiner Anstieg sowohl in den Werten der Kontroll- als auch der Zusatzkulturen auf. Lediglich nach 72 Stunden mit 0,15 mg% Folsäurezusatz sinkt das arithmetische Mittel unter die Angaben im Originalausstrich. Eine statistische Erfassung ergibt bis auf den 24-Stunden-Wert bei 1,5 mg% Folsäurezusatz signifikante Werte (Tab. 5).

Nach 24 Stunden Bebrütung nehmen die Indices unter 1,5 mg% Folsäuregaben nicht signifikant und mit 0,15 mg% Folsäure signifikant zu. Eine signifikante Verminderung ist in der 48-Stunden-Kultur nach 1,5 mg% Folsäurezugabe zu beobachten. Mit der geringeren Konzentration erreichen die Indices wieder die Kontrollwerte. Nach 72 Stunden werden die Indices mit 1,5 mg% Folsäure gering, mit 0,15 mg% stark gegenüber den Kontrollen herabgesetzt. Eine allgemein abfallende Tendenz demonstrieren die Kulturen innerhalb verschiedener Bebrütungszeiten der Zusatzkoagula.

Diese allgemeinen Aussagen werden in der individuellen Reaktion nicht immer bestätigt. Fall I zeigt verminderte Indices, je höher die Folsäurekonzentration ist. Im Fall III bewirken die Zusätze in der 24-Stunden-Kultur zwar eine Erhöhung der Mitose-Indices, nach 48 Stunden jedoch wieder einen Abfall. Die Retikuloze IV spricht auf Folsäure in der 24-Stunden-Kultur ebenfalls an, verringert die Indices aber mit höherer Konzentration. Relativ unbeeinflusst scheint die Ca-Anämie V zu sein, während das gleiche Krankheitsbild VI mit deutlich erhöhten Indices reagiert. Bei der sideroachrestischen Anämie VII finden wir steigende Mitose-Indices entgegengesetzt zum Konzentrations-

gefälle. Im Fall der Myeloblastenleukämie VIII beobachtet man nach 1,5 mg% Folsäure einen Anstieg der Mitose-Indices in den 24- und 48-Stunden-Kulturen, im übrigen sehr differierende Werte.

Die Granulopoese zeigt in den Kulturen verglichen mit dem Originalausstrich verminderte Mitose-Indices. Abweichungen der Zusatz- von den Kontrollwerten unterliegen nur geringfügigen, überwiegend nicht signifikanten Schwankungen (Tabellen 6 und 7). Eine deutliche Beeinflussung der Mitose-Indices in der Granulopoese können wir daher mit Folsäurezusätzen nicht erkennen.

F. Karyologische Kurven (Abbildung 9).

Die Verteilung der Mitosephasen wird in den karyologischen Kurven getrennt für Erythropoese und Granulopoese dargestellt. Wegen zu kleiner Zahlen werden die entsprechenden Mitosen der Zusatzkulturen zusammengefaßt und mit den Kontrollkurven verglichen.

In der Erythropoese liegen die 53,8 % Prophasen der Zusatzkulturen um 14,9 % unterhalb, die 39,6 % frühen Metaphasen dagegen um 17,4 % oberhalb der Kontrollwerte. 3,8 % späte Metaphasen und 1 % Anaphasen unterschreiten die Kontrollkurve, während die Telophasen mit 1,9 % wieder geringfügig ansteigen. Rekonstruktionsphasen werden nicht gefunden.

Nur geringe Abweichungen von den Kontrollwerten verdeutlichen die karyologischen Kurven der Granulopoese, so daß wir in der weißen Reihe auch keine gehemmten Mitosephasen vorfinden.

IV. Diskussion.

Der Einfluß der Folsäure auf menschliches Knochenmark wird in der Literatur vielfach beschrieben, doch handelt es sich überwiegend um in vivo-Untersuchungen. Ein Maßstab zum Vergleich der in vivo- mit in vitro-Ergebnissen existiert nicht, so daß wir die Untersuchungen nur unter Vorbehalt in Beziehung setzen dürfen. Die wenigen veröffentlichten in vitro-Arbeiten basieren vorwiegend auf anderen Voraussetzungen wie unterschiedliche Methoden der Kultivierung, Auswertung ohne ausreichende Differenzierung der Zellen bzw. nach anderer Fragestellung usw.. Nur in zwei Arbeiten wird die CARRELSche Methode der Kultivierung im hängenden Koagulum angewandt, in den Untersuchungen von PARREIRA sowie BOLL und SCHLAG (14, 16).

An 8 untersuchten Knochenmarkproben wird die Folsäurewirkung speziell auf die Erythropoese in vitro untersucht. Nach 24-stündiger Bebrütung des Sternalmarks beobachten wir in den Kontrollkulturen eine generelle Reifungsförderung gegenüber den Originalausstrichen. Ein gleichzeitig bestehender signifikanter Anstieg der Mitose-Indices spricht für eine Proliferationsförderung. Diese Steigerung der Proliferation in den 24-Stunden-Kontrollwerten könnte eine Stimulierung der Erythropoese durch die Kulturbedingungen bedeuten, wie BOLL entsprechend für die Granulopoese feststellte (7). Ein gleichzeitig verminderter G/E-Index deutet trotz der Reifungsförderung auf einen relativen Anstieg des Erythroblasten-Anteils durch vermutlich verzögerte Entkernung hin. Diese verminderten G/E-Indices beobachten wir auch in allen Zusatzkulturen nach 24-stündiger Bebrütung, jedoch sind die Unterschiede nicht signifikant (Tab. 3).

Die Stimulierung unter Kulturbedingungen bedeutet jedoch nicht, daß die Nährsubstanz Corhormon eine Verschiebung der Zell-

zusammensetzung verursacht. Sobald der Transplantationschock überwunden ist, setzt die Proliferation ein (7). In der Granulopoese wird ein Nachlassen der Schockwirkung mitunter schon nach 6 Stunden beobachtet (51). Die Zusammensetzung des Knochenmarks in der Kultur wird dann nur von Reifung, Teilung und Zelltod der vom Mutterboden getrennten Zellen bestimmt. BOLL und FUCHS haben bewiesen, daß die Zellverteilung innerhalb der uns interessierenden ersten 3 Tage nicht wesentlich vom Kulturmedium beeinflußt wird (12).

Bisher ist nicht geklärt, ob Corhormon Folsäure enthält, insofern wir mit einem unbekannten Faktor rechnen müßten. Einer Mitteilung der Herstellerfirma des Corhormon zufolge liegt der pH-Wert der Corhormonlösung bei ca. 8,2, so daß Folsäure nicht zerstört werden könnte, falls sie im Präparat enthalten ist. Da die Folsäure jedoch durch Tageslicht inaktiviert wird, kommt sie wahrscheinlich nicht mehr zur Wirkung (17), denn Corhormon-Ampullen werden in normalem Glas geliefert.

Die angewandte Dosis von 1,5 mg% Folsäure auf 5 l Blut berechnet ergibt 75 mg Folsäure im Blut des menschlichen Körpers. Da die Verträglichkeitsgrenze bei ca. 400 mg liegen soll, dürften unsere Konzentrationen nicht toxisch wirken, auch wenn wir berücksichtigen, daß ein Drittel bis zur Hälfte der zugeführten Folsäure schon in 24 Stunden mit dem Urin wieder ausgeschieden wird (14, 65). Die niedrige Konzentration von 0,15 mg% liegt mit 7,5 mg im Gesamtblut sogar noch unterhalb der oral applizierten therapeutischen Dosis von 15 mg / die (24).

Verwenden wir die hohe Dosis von 1,5 mg% Folsäure in der Kultur, so lassen sich keine einheitlichen Effekte beobachten. Eine allgemeine Regenerationssteigerung nach 24 Stunden ist mit unterschiedlicher Ausreifung verbunden, so daß wir über

die Proliferation keine übereinstimmenden Aussagen machen können. Im wesentlichen sind die Ergebnisse denen der Konzentration von 0,15 mg% ähnlich, ohne daß wir von einer erhöhten Wirkung oder Toxizität durch Anwendung der höheren Dosis sprechen können. In einigen Fällen tritt eher eine verminderte Reaktion bei höherer Dosierung der Folsäure auf.

In den Fällen der relativ normalen Hämatopoese (Fall I und II) hat die Folsäure in beiden Konzentrationen nur einen unbedeutenden Einfluß. Das entspricht der Ansicht SWANS und HÄRKÖNENS, eine Folsäurewirkung sei nur bei zuvor bestandem Folsäuremangel zu erwarten (27, 59). Ob in den übrigen untersuchten Knochenmarkproben ein Folsäuremangel bestanden hat, wurde nicht festgestellt. Ein typisches Megaloblastenmark, das in der Literatur häufig mit einem Folsäuremangel in Zusammenhang gebracht wird, ist nicht im Untersuchungsgut, da über die Einwirkung der Folsäure auf das Megaloblastenmark schon viele Veröffentlichungen existieren (5, 18, 19, 40, 41, 46, 48, 49, 59, 66).

Die Dosis von 0,15 mg% Folsäure zum Kulturmedium bewirkt überwiegend eine Linksverschiebung der Erythropoese. Betrachten wir die Reifung der einzelnen Zellklassen, so werden besonders die basophilen und oxyphilen Erythroblasten erhöht. Die Mitose-Indices der Kontrollkulturen liegen etwas über dem von BOLL und MERSCH errechneten mittleren Index von 15% (13), jedoch innerhalb der von ROHR angegebenen Grenzen von 5 - 30 % (52). Nach 24-stündiger Bebrütung mit Folsäurezusatz sind die Mitoseindices gegenüber den Kontrollwerten angestiegen. Diese Erhöhung der Mitoseindices müssen wir nach BOLL und MERSCH (13) als eine Funktion der Linksverschiebung ansehen. Insofern braucht die Linksverschiebung nicht als Reifungshemmung gedeutet zu werden, es könnte sich zusammen mit

der Regenerationssteigerung, zumal der Anstieg der Mitoseindices signifikant ist, um eine echte Proliferationssteigerung der Erythropoese handeln, wie ZUELZER auch in vivo beobachtete (66).

Als weiterer Parameter, eine Proliferationskinetik zu beurteilen, gelten die karyologischen Kurven. Während unter Folsäurezusatz die Prophasen und damit die in Mitose tretenden Zellen vermindert sind, liegen die frühen Metaphasen, selbst unter Berücksichtigung des ständigen Wechsels früher in späte Metaphasen über den Kontrollwerten (8, Abb. 9). Der hohe Anteil früher Metaphasen deutet demnach auf eine Verlängerung dieser Phase bei einer Verkürzung der Prophase hin. Eine Verlängerung der Mitosedauer (t_m) wiederum beeinflusst direkt den Mitose-Index (MI) nach der Definition $MI = m \cdot t_m$, wobei (m) die Mitoserate, also die Zahl der sich pro Zeiteinheit teilenden Zellen bedeutet (10). Es ist möglich, daß die Mitosedauer unter Folsäurezusatz in der Metaphase etwas verlängert ist und somit ein besonders hoher Mitoseindex resultiert. Eine Aufklärung, ob eine Arretierung einer Mitosephase vorliegt, gelingt letztlich nur durch eine Beobachtung lebender Knochenmarkzellen im Phasenkontrastmikroskop.

Der Folsäurezusatz vermindert die G/E-Indices in den vergleichbaren Kulturzeiten, jedoch sind die Werte nicht signifikant unterschiedlich. Zusammen mit der Linksverschiebung spricht der G/E-Index für eine nicht nur prozentuale Erhöhung der Zellzahl in der Erythropoese und damit für eine reale Steigerung der Proliferation der Erythropoese. Fassen wir allgemein die Parameter der Proliferation zusammen, so ergibt sich eine leichte Proliferationssteigerung der Erythropoese unter dem Einfluß von 0,15 mg% Folsäure.

Unsere Ergebnisse werden in den Untersuchungen von PARREIRA bestätigt, der mit einer Konzentration von 1 mg% Folsäure Reifungsbeschleunigungen und erhöhte Mitoseindices in 2 Fällen beobachtete. Bei kritischer Durchsicht fällt auf, daß der erhöhte stathmokinetic Index auf den basophilen Anteil der Erythropoese beschränkt ist, während bei den anderen Zellklassen überwiegend Reifungsverzögerungen vorliegen. Die Reifungsförderung der basophilen Erythroblasten kann mit zuvor bestandem Folsäuremangel erklärt werden, da es sich in beiden untersuchten Fällen um megaloblastäres Knochenmark handelt (46). Über schnellere Ausreifung und erhöhtes Zellwachstum in Suspensionskulturen von megaloblastischem Mark berichten auch SWAN und Mitarbeiter, während sie durch Zugabe von Folsäure zum normoblastischen Mark kein signifikantes Zellwachstum erzielen (60). Eine entsprechende spezifische Wirkung der Folsäure auf basophile Erythroblasten beobachtet ZUELZER auf Grund von in vivo-Untersuchungen (66). Setzen wir in unseren Ergebnissen die Mitosen der basophilen und Proerythroblasten zur Gesamtzahl der Mitosen in Beziehung, so ergibt sich ebenfalls eine deutliche Stimulierung unreifer Zellformen unter dem Einfluß von Folsäure. Der prozentuale Anteil unreifer Zellen an der Gesamtzahl der Mitosen in der Erythropoese beträgt in den Kontrollversuchen 10,1 %, nach Zugabe von 0,15 mg% Folsäure 25,6 % und nach 1,5 mg% Folsäureanreicherung 36,6 %.

Die spezifische Wirkung der Folsäure auf die rote Reihe des Knochenmarks drückt sich schon in der Entstehung von Megaloblastenanämien unter Folsäuremangel aus. Möglicherweise wirkt die Folsäure in Überdosierung auf den DNS-Stoffwechsel, wodurch stärker proliferierende Gewebe vorrangig geschädigt werden können. Wie BOLL und FUCHS zeigen, neigen die Zellen der Erythropoese in der Kultur zu schnellerer Aus-

reifung als die der Granulopoese (12). Die starke Wirkung der Folsäure auf die basophilen Erythroblasten könnte eventuell mit der kürzeren Generationszeit dieser Zellklasse gegenüber den anderen erythropoetischen Reifungsklassen erklärt werden. Sie beträgt nach BOLL bei den basophilen Erythroblasten nur 25 Stunden (13). Diese Überlegungen zeigen, daß die unreife Erythropoese durch Folsäure in den angewandten Konzentrationen *in vitro* stimuliert werden kann. Besonders deutlich kommt das bei der untersuchten sideroachrestischen Anämie mit starker Linksverschiebung im Ausgangspräparat zum Ausdruck.

Betrachten wir die Kontrollkurve der sideroachrestischen Anämie (VII), so ähnelt dieses Krankheitsbild, abgesehen von einer verstärkten Ausreifung nach 24 Stunden, der Normalverteilung sideroachrestischer Anämien nach BOLL und MERSCH. Unter Folsäurezusatz erhöhen sich die Anteile aller unreifen Zellklassen, besonders der polychromatischen Erythroblasten. Die von BOLL und MERSCH beschriebene hohe Regeneration am 1. Kulturtag nimmt nach Folsäurezusatz eher noch etwas zu (13). Möglicherweise entsteht die hier beobachtete Regenerationserhöhung jedoch auf Grund zu kleiner Mitosezahlen. Nach 48 Stunden setzen mit 0,15 mg% Folsäurezusatz eine Ausreifung und mit 1,5 mg% eine verstärkte, jedoch nicht signifikante Reifungsförderung ein (Abb. 7, Tab. 1).

In der Granulopoese der sideroachrestischen Anämie zeichnet sich unter der Einwirkung von 1,5 mg% Folsäure eine signifikante Regenerationssteigerung ab (Tab. 6 u. 7). Mit zunehmender Bebrütungszeit wird eine Ausreifung granulopoetischer Frühformen unter dem Einfluß beider Folsäurekonzentrationen deutlich. Ein ansteigender G/E-Index nach Folsäurezugabe spricht schließlich bei diesem Krankheitsbild für eine Steigerung der Proliferation in der Granulopoese.

Bei dem akuten Schub einer myeloischen Leukämie (VIII) fällt ein besonders hoher Anteil unreifer Vorstufen in der roten Reihe auf. Diese Linkverschiebung läßt zusammen mit dem G/E-Index auf eine Erythroleukämie schließen, da wir bei chronischen Myelosen mit einem Anstieg des G/E-Index auf durchschnittlich 12,1 rechnen müßten. Außerdem könnte für eine Erythroleukämie die mangelhafte Reifungstendenz der Erythropoese in den Kontrollen sprechen. Unter 1,5 mg%, mehr noch unter 0,15 mg% wird der hohe Anteil oxyphiler Zellen reduziert, so daß wir von einer zunehmenden Ausreifung dieses Zelltyps sprechen können. Auffallend stark werden unter Folsäurezusatz nach 24 Stunden die basophilen Erythroblasten vermehrt, deren hoher Prozentsatz noch nach 48 und 72 Stunden die Differentialverteilung der Erythropoese beherrscht, jedoch später ebenfalls abnimmt, was auf eine gewisse Ausreifung hindeutet. Eine gleichzeitig erhöhte Regeneration nach 48 Stunden spricht schließlich für eine verspätet einsetzende Proliferationssteigerung. Vielleicht neigt das erythroleukämische Knochenmark in den von uns angewandten Konzentrationen nach 24 Stunden Bebrütungsdauer zu einer leicht toxischen Reaktion. Mit zunehmender Kultivierungszeit scheint der hohe Zusatz Folsäure verbraucht zu sein, so daß schließlich eine stimulierende Konzentration vorliegt.

Da BOLL und SCHLAG mit 1 bis 10 mg% Teroplerin auf lymphatische und myeloische Leukämien keine Regenerationsveränderungen und unterhalb 0,1 mg% überhaupt keine Teroplerinwirkung feststellen (14), ist anzunehmen, daß Folsäure seine Wirkung in geringerer Konzentration als Teroplerin entfaltet.

Allgemein steht der Proliferationssteigerung der Erythropoese nach Folsäurezusatz eine unwesentliche Beeinflussung der

Granulopoese gegenüber. Die Proliferationsparameter Reifung und Regeneration unterscheiden sich in der Granulopoese nach Folsäurezusatz, abgesehen von der sideroachrestischen Anämie (VII), nur geringfügig und überwiegend nicht signifikant von den Kontrollwerten (Tab. 6 und 7).

V. Zusammenfassung.

Die Wirkung der Folsäure auf die Proliferation menschlichen Knochenmarks wird in vitro untersucht. Den Sternalmarkkulturen von 8 Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen werden jeweils 1,5 und 0,15 mg% Folsäure zugesetzt. Nach 24- bis 72-stündiger Bebrütung werden die Zusatz- mit Kontrollkulturen verglichen.

Eine Auswertung der Versuchsreihen ergibt eine leichte Proliferationssteigerung in der Erythropoese unter dem Einfluß von Folsäure. Während mit beiden Konzentrationen Regenerationssteigerungen zu erkennen sind, werden die übrigen Parameter der Proliferationskinese diskutiert. Die geringere Konzentration erzielt eine relative Zunahme der unreiferen Erythroblasten, während die höhere Konzentration variierende Reifungstendenzen zeigt.

Der Einfluß der Folsäure auf die Granulopoese ergibt in vitro unbedeutende Abweichungen von den Kontrollwerten. Lediglich im Fall einer sideroachrestischen Anämie wird die Proliferation der Granulopoese gesteigert.

Die Reifungsförderung der Erythropoese und Granulopoese bei einer Erythroleukämie werden diskutiert.

VI. Literatur.

1. ANGIER, R.B. u. Mitarb.: The structure and synthesis of the liver L. casei factor.
Science 103, 667 (1946).
Zitiert nach H. Zellweger, W.A. Adolph:
Vitamine und Vitaminkrankheiten.
Handbuch der Inneren Medizin, 4. Auflage, Bd. VI/2,
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954.
2. ARNSTEIN, H.R.V.: The function of vitamin B₁₂ and folic acid in the metabolism of one - carbon units.
Internat. Z. Vitaminforsch. 26, 384 (1956).
3. BATATA, M. et al.: Blood and bone marrow changes in elderly patients with special reference to folic acid, vitamin B₁₂, iron and ascorbic acid.
Brit. Med. J. 2, 667 (1967).
4. BEGEMANN, H.: Leber, Vitamin B₁₂, Magenfaktoren, Folsäure.
In: Handbuch der gesamten Hämatologie, Bd. III/1, 118
hrsg. v. L. Heilmeyer u. A. Hittmair
Urban und Schwarzenberg, München 1960.
5. BOCK, H.E., J. HARTJE, D. MÜLLER und W. WILMANNS:
Thyminnucleotid - Synthese und Proliferation von Knochenmarkzellen bei megaloblastären Anämien unter Einwirkung von Vitamin B₁₂.
Klin. Wschr. 45, 176 (1967).
6. BOLL, I.: Die Proliferationskinetik der normalen und leukämischen Granulocytopoese.
Fol. haemat. (Leipzig) 91, 172 (1969).
7. BOLL, I.: Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.
Springer Verlag, Heidelberg 1966.

8. BOLL, I.: Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro; I. Granuloblastenmitosen.
Folia haemat. 3, 58 (1958).
9. BOLL, I.: Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro; I. Granuloblastenmitosen.
Folia haemat. 3, 78 (1958).
10. BOLL, I.: Some Problems in Estimating Proliferative Kinetics of Granulocytopoiesis.
Proc. 9th Congr. europ. Soc. Haemat., Lisbon.
S. Karger, Basel/New York 1963.
11. BOLL, I.: Über die Behandlung der akuten Leukämien mit Folsäureantagonisten und ACTH unter Berücksichtigung eines eigenen Falles.
Ärztl. Wschr. 8, 516 (1953).
12. BOLL, I. u. G. FUCHS: Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro.
Blut VII, 257 (1961).
13. BOLL, I. u. G. MERSCH: Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro.
Blut XVII, 193 (1968).
14. BOLL, I. u. H. SCHLAG: Untersuchungen über die Einwirkung von Teropterin und Aminopterin auf menschliches Knochenmark in vitro.
Z. Krebsforsch. 57, 643 (1951).
15. BONSDORFF, B. v.: Megaloblastische Anämien.
In: Handbuch der gesamten Hämatologie, Bd. III
hrsg. v. L. Heilmeyer u. A. Hittmair
Urban und Schwarzenberg, München 1960.

16. CHANARIN, I., M. HUTCHINSON u. A. Mc LEAN:
Hepatic folate in man.
Brit. Med. J. 1, 396 (1966).
17. CHEMIEWERK HOMBURG: Mitteilungen (1969).
18. COX, E.V., D.M. MATTHEWS, M.J. MEYNELL, W.T. COOKE
and R. GADDIE: Cyanocobalamin, Ascorbic Acid and
Pteroylglutamates in Normal and Megaloblastic
Bone Marrow.
Blood 15, 376 (1960).
19. DAWSON, D.W.: The Bone Marrow Picture of Folic Acid
Deficiency in Pregnancy.
J. Obstet. Gynaec. Brit. Comm. 69, 38 (1962).
20. DOCTOR, V.M.: Studies in vivo on the Conversion of Folic
Acid to Citrovorum Factor.
J. biol. Chem. 233, 982 (1958).
21. DONALDSON, K.O. and J.C. KERESZTESY: The Interconversion
of Prefolic A and Tetrahydrofolic Acid.
Fed. Proc. 20, 453 (1961).
22. FLEISCHHACKER, H.: Anämien infolge Störung der Erythro-
poese durch Vitamin-B₁₂- oder/und Folsäuremangel.
Wien. Z. Inn. Med. 42, 345 (1961).
23. Geigy Dokumenta, Wissenschaftliche Tabellen.
J.R. Geigy, Basel 1960.
24. GIRDWOOD, R.H.: Vitamin B₁₂- und Folsäuremangelkrankheiten
beim Menschen.
Klin. Wschr. 36, 933 (1958).
25. GRANT, H.C., A.V. HOFFBRAND and D.G. WELLS:
Folate Deficiency and Neurological Disease.
Lancet II, 763 (1965).

26. HAEHNER, E., H. LUDES und R. LOZANO: Der perorale Folsäurestoßtest bei der Leukämie und beim Morbus Hodgkin.
Münch.med.Wschr. 14, 500 (1956).
27. HÄRKÖNEN, M. and A. KIVIRANTA:
Effects of Folic Acid on Cell Division.
Ann.Med.Exper.Fenn. 36, 213 (1958).
28. HAYS, E.E.: Method for studying effect of various substances upon red cell maturation in - vitro.
Amer.J.med.Sci. 216, 528 (1948).
29. HEATH, C.W.: Cytogenetic Observations in Vitamin B₁₂ and Folate Deficiency.
Blood 27, 800 (1966).
30. JASINSKI, B.: Folsäure- und Vitamin-B₁₂-Stoffwechsel und -Therapie.
Schweiz.med.Wschr. 89, 1225 (1959).
31. KIMBEL, K-H.: Die Rolle der Folsäure bei der Blutbildung.
Dtsch.med.Wschr. 75, 837 (1950).
32. KLIPSTEIN, F.A.: Folate deficiency secondary to disease of the intestinal tract.
Bull. N.Y. Acad.Med. 42, 638 (1966).
33. KNOWLES, I.P., T.A.J. PRANKERD and R.G. WESTALL:
Folic acid requirements in man.
J.Physiol. (Lond.) 157, 24 (1961).
34. LETTRÉ, H. u. C. LANDSCHÜTZ, zit. nach I. Boll u. H.Schlag:
Untersuchungen über die Einwirkung von Teropterin und Aminopterin auf menschliches Knochenmark in vitro.
Z.Krebsforsch. 57, 643 (1951).

35. LIEBERMANN, I. and P. OVE: Control of Growth of Mammalian Cells in Culture with Folic Acid, Thymidine and Purines. J. biol. Chem. 235, 1119 (1960).
36. LITTLE, P., J. OLESON and Y. SUBBAROW: Effect of nutrition on tumor response in Rous chicken sarcoma. Jour. Lab. Clin. Med. 33, 1139 (1948).
37. LUDES, H., R. LOZANO y O. ORTIZ: El test de elimination urinaria de acido fólico en el diagnóstico de las enfermedades malignas. Med. clin. (Barcelona) 27, 167 (1956).
38. MAGNUS, E. M.: Low serum and red cell folate activity in adult celiac disease. Amer. J. dig. Dis., N.S. 11, 314 (1966).
39. MARSHALL, R. A. and J. H. JANDL: Response to physiologic doses of folic acid in the megaloblastic anemias. A. M. A. Arch. intern. Med. 105, 352 (1960).
40. MENZIES, R. C., P. E. CROSSEN, P. H. FITZGERALD and F. W. GUNZ: Cytogenetic and Cytochemical Studies on Marrow Cells in B₁₂ and Folate Deficiency. Blood 28, 581 (1966).
41. METZ, J., H. FELSENSTEIN and P. WELCH: Effects of Folic Acid and Vitamin B₁₂ Supplementation on Tests of Folate and Vitamin B₁₂ Nutrition in Pregnancy. Amer. J. clin. Nutr. 16, 472 (1965).
42. MITCHELL, H. K., E. E. SNELL and R. J. WILLIAMS: The Concentration of Folic Acid. J. Amer. Chem. Soc. 63, 2284 (1941).
43. MØLLER, K. O.: Pharmakologie. Schwabe u. Co Verlag, Basel/Stuttgart 1966.

44. NORRIS, E.R. and J.J. MAJNARICH: Effect of pteridines and blood serums on human bone marrow cells in vitro. Amer.J.Physiol. 153, 496 (1948).
45. O'BRIEN, J.S.: The Role of the Folate Coenzymes in Cellular Division. Cancer Res. 22, 267 (1962).
46. PARREIRA, F.: A accao - in vitro - da vitamina B₁₂, ácido fólico e uracilo sobre a medula óssea de dois casos de anemia megaloblástica. Gaz.méd.portug. 6, 527 (1953).
47. RAUEN, H.M.: Biochemisches Taschenbuch. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964.
48. REYNOLDS, E.H., G. MILNER, D.M. MATTHEWS and I. CHANARIN: Anticonvulsant Therapy, Megaloblastic Haematopoiesis and Folic Acid Metabolism. Quart.J.Med., N.S. 35, 521 (1966).
49. RIVERA, J.V., F. RODRIGUEZ DE LA OBRA and M. MARTINEZ MALDONADO: Anemia due to Vitamin B₁₂ Deficiency after Treatment with Folic Acid and in Tropical Sprue. Amer.J.clin.Nutr. 18, 110 (1966).
50. ROBERTS, D. and T.C. HALL: Studies on Folic Reductase II. Enzyme Activity of Embryonic Organs of the Chicken, Rat and Human. Cancer Res. 25, 1894 (1965).
51. RÖHLING, H.: Die Proliferationskinetik der Granulocytopoese am ersten Kulturtag bei "normalem" und megaloblastischem Knochenmark. Med.Diss. FU Berlin 1969.
52. ROHR, K.: Das menschliche Knochenmark. Thieme Verlag, Stuttgart 1960.

53. ROSE, D.P.: Folic Acid Deficiency in Leukaemia and Lymphomas
J.clin.Path. 19, 29 (1966).
54. SCHREIER, K.: Folsäuregruppe.
In: Physiologische Chemie, Lehr- und Handbuch
hrsg. v. B. Flaschenträger u. E. Lehnartz
II. Der Stoffwechsel 2. Teil, Bd. d / Teil α
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1966.
55. SNELL, E.E. and W.H. PETERSON: zit. nach B. Jasinski:
Folsäure- und Vitamin-B₁₂-Stoffwechsel und -Therapie.
Schweiz.med.Wschr. 89, 1225 (1959).
56. SPECTOR, I. and A.M. HUTTER: Folic Acid Deficiency in
Neoplastic Disease.
Amer.J.med.Sci. 252, 419 (1966).
57. SPIES, T.D., C.F. VILTER, M.B. KOCH and M.H. CALDWELL:
Observations of the Antianemic Properties of
Synthetic Folic Acid.
South.Med.J. 38, 707 (1945).
58. STOCK et al.: zit. nach M. Härkönen and A. Kiviranta:
Effects of Folic Acid on Cell Division.
Ann.Med.Exper.Fenn. 36, 213 (1958).
59. SWAN, H.T., E.D. REISNER and M. SILVERMAN: The Effect
of Various Metabolites on the Growth of Marrow Cells
in vitro.
Blood 10, 735 (1955).
60. SWENSEID, M.E., F.H. BETHELL and O.D. BIRD: The
Concentration of Folic Acid in Leukocytes.
Observations on Normal Subjects and Persons with
Leukemia.
Cancer Res. 11, 864 (1951).

61. VARADI, S., D. ABBOTT and A. ELWIS: Correlation of
Peripheral White Cell and Bone Marrow Changes
with Folate Levels in Pregnancy and Their Clinical
Significances.
J.clin.Path. 19, 33 (1966).
62. WILMANN, W.: Die Bedeutung von Folsäure und Vitamin B₁₂
für den Zellstoffwechsel.
Dtsch.med.Wschr. 89, 2093 (1964).
63. WILMANN, W.: Zum Wirkungsmechanismus von Folsäure-
und Purinantagonisten bei der Behandlung akuter
Leukämien.
Folia haemat. (Frankfurt) 8, 118 (1963).
64. WILMANN, W. und L. JAENICKE: Die Bedeutung des
Folsäurestoffwechsels für die normale und patholo-
gische Reifung von Blutzellen.
Klin.Wschr. 41, 1077 (1963).
65. ZELLWEGER, H., W.A. ADOLPH: Vitamine und Vitamin-
krankheiten.
Handbuch der Inneren Medizin, 4. Auflage,
Band VI / 2, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-
Heidelberg 1954.
66. ZUELZER, W.W.: Normal and Pathologic Physiology of
the Bone Marrow.
Amer.J.Childr. 77, 482 (1949).

Mein aufrichtiger Dank gilt Frau Professor Dr. med.
Irene Boll für die geduldige und wertvolle Unterstützung
dieser Arbeit.

Lebenslauf.

Am 12. 11. 1938 in Essen geboren. Nach dem Besuch der
Grundschule in Hessen, Kreis Wernigerode, und des
Städtischen Gymnasiums in Goslar/Harz Reifeprüfung 1959
am Bonner E. M. A. -Gymnasium. Nach zwei Semestern
Volkswirtschaft in Bonn und Freiburg Studium der Zahn-
heilkunde in Kiel, Bonn, München und Berlin.
1963 zahnärztliche Vorprüfung in Bonn und 1966 zahnärztliche
Prüfung in Berlin.
Zur Zeit als Assistent in einer zahnärztlichen Praxis in
Berlin-Spandau tätig.

